

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

NOUVELLE APPROCHE ANTI-RÉTROVIRALE :  
ALTÉRATION DU GÉNOME DU VIRUS CAS-BR-E MULV  
À L'INTÉRIEUR DE LA CELLULE HÔTE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
STÉPHANIE DUHAMEL

MARS 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## **REMERCIEMENTS**

Je souhaiterais tout d'abord adresser mes remerciements au Dre Elsy Édouard, qui m'a permis de travailler sur un projet aussi novateur et intéressant. Et qui a aussi su me diriger avec soin, attention et disponibilité.

Également, au Dr Éric Rassart, qui m'a permis de travailler dans son laboratoire, ainsi que Philippe Legault, qui a assuré une partie de l'aide technique pour les clonages, de même que tous les étudiants du laboratoire qui m'ont conseillé et éclairé durant mes deux années de maîtrise.

Je voudrais aussi remercier mes parents pour leur support et leurs encouragements. Ainsi que tous mes amis qui sont demeurés là en dépit du fait que je n'étais pas souvent disponible pour eux.

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	iiiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xv

### PARTIE INTRODUCTIVE

#### Chapitre I.

Problématique.....	1
--------------------	---

#### Chapitre II.

##### Les rétrovirus

2.1	Introduction.....	4
2.1.1	Cycle de réplication des rétrovirus.....	6
2.2	Les rétrovirus humains pathogènes.....	7
2.2.1	Le virus HIV-1.....	7
2.2.2	Le virus HTLV-I.....	11
2.3	Le rétrovirus de la leucémie murine .....	15
2.3.1	Le virus Cas-Br-E.....	15

#### Chapitre III

##### L'intégrase

3.1	Introduction.....	18
3.1.1	Mécanisme de l'intégration .....	18
3.1.2	Caractéristique de l'intégrase rétrovirale.....	19

## Chapitre IV

### Les traitements antiviraux

4.1	Traitement anti-rétroviral actuellement disponible.....	23
4.2	L'intégrase comme nouvelle cible anti-rétrovirale.....	25

## Chapitre V

### Chiméraplastie et utilisation d'oligonucléotides modifiés

5.1	Introduction.....	27
5.2	Type d'oligonucléotides.....	29
5.2.1	Les RDO ou chiméraplastes .....	29
5.2.2	Les ODN .....	30
5.3	Optimisation des traitements .....	33

## PARTIE MÉTHODOLOGIQUE

### Chapitre VI

#### Matériels et méthodes

6.1	Design des ODN modifiés .....	36
6.1.1	Oligonucléotides modifiés .....	36
6.2	Modèles expérimentaux .....	38
6.2.1	Introduction .....	38
6.2.2	Traitement de la lignée cellulaire NIH NE-8 chroniquement infectée par le rétrovirus Cas-Br-E .....	39
6.2.3	Traitement des cellules NIH 3T3 infectées par le rétrovirus Cas-Br-E .....	39
6.3	Analyses des effets des traitements .....	40
6.3.1	Détermination du titre viral .....	40
6.3.2	Effet des traitements sur la production virale et l'activité de la transcriptase inverse .....	41
6.3.3	Analyse de l'ADN proviral .....	41
6.3.4	Analyse de l'ARN viral .....	44

6.3.5	Analyse des protéines virales .....	44
-------	-------------------------------------	----

## PARTIE RÉSULTATS

### Chapitre VII

#### Effets des traitements sur les cellules NIH NE8

7.1	Mise au point des conditions de transfection .....	46
7.2	Traitement des cellules NIH NE8 .....	49
7.2.1	Titre viral déterminé par titration des virus produits par immunofluorescence .....	49
7.2.2	Analyse de l'activité de la transcriptase inverse déterminé par tests rAdT .....	54

### Chapitre VIII

#### Effets des traitements sur les cellules NIH 3T3 infectées par le rétrovirus Cas-Br-E MuLV et traitées à différents temps post-infection

8.1	Traitement des cellules NIH 3T3 infectées par le rétrovirus Cas-Br-E MuLV et traitées à différents temps post-infection	
8.1.1	Titre viral déterminé par titration des virus produits par immunofluorescence .....	56

### Chapitre IX

#### Infectiosité des virus produits par les cellules traitées

9.1	Analyse des virus produits par les cellules NIH NE8 traitées .....	60
-----	--	----

### Chapitre X

#### Effet des traitements sur les protéines des cellules traitées

10.1	Introduction .....	63
10.2	Analyse des Analyse de l'ARN des cellules traitées aux ODN .....	63
10.3	Analyse des protéines totales des cellules traitées aux ODN.....	65

## Chapitre XI

### Effet des traitements sur le génome des cellules traitées

11.1	Analyse du génome par alignement des séquençages directs des produits de PCR .....	67
11.2	Analyse du génome par séquençage direct des produits de PCR .....	68
11.2.1	Analyse de l'ADN .....	68
11.2.2	Analyse de l'ARN .....	71
11.3	Analyse du génome par séquençage des clones des produits de PCR .....	74

## PARTIE DISCUSSION

## Chapitre XII

### Analyse de l'effet des traitements sur les cellules

12.1	Effet des ODN sur les cellules NIH NE8, chroniquement infectées par Cas-Br-E MuLV .....	77
12.1.1	Effet sur le titre des virus infectieux.....	78
12.1.2	Effet sur la transcriptase inverse .....	78
12.2	Effet des ODN sur les cellules NIH 3T3 infectées par Cas-Br-E MuLV et traitées à différents temps post-infection .....	79
12.2.1	Effet sur le titre des virus infectieux.....	79
12.3	Effet des traitements sur l'expression de l'intégrase .....	80
12.4	Analyse des traitements sur le génome des cellules traitées.....	81
12.4.1	Analyse de l'ADN par séquençage direct des produits de PCR .....	81
12.4.2	Analyse de l'ARN par séquençage direct des produits de PCR .....	83
12.5	Analyse du génome par séquençage des clones obtenus .....	83

## Chapitre XIII

### Analyse du pouvoir infectieux des virus produits par les cellules traitées

13.1	Effet des traitements sur les virus produits par les cellules NIH NE8 traitées .....	87
------	--	----

## Chapitre XIV

## Mécanismes d'action des ODN mutagènes ciblant l'intégrase

14.1 Mécanisme potentiel des ODN autre que la chiméraplastie.....	88
14.2 Possibilité d'un effet dominant négatif.....	89

CONCLUSION .....	90
------------------	----

BIBLIOGRAPHIE .....	93
---------------------	----



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
2.1	Structure d'un virion avec ses diverses protéines et récepteurs de surface .....4
2.2	Représentation schématique du génome d'un rétrovirus .....5
2.3	Cycle de réplication d'un rétrovirus .....6
2.4	Structure du virion de HIV .....7
2.5	Représentation schématique du génome du HIV .....8
2.6	Cinétique de l'infection par HIV. Évolution de la quantité de cellule CD4+ de même que des anticorps cours de l'infection par HIV en fonction du nombre de copie d'ARN viral/ml.....10
2.7	Représentation schématique du génome du virus HTLV-I .....12
2.8	Cellules du sang infectées par HTLV-I .....14
2.9	Représentation schématique du rétrovirus de la leucémie murine .....15
3.1	L'intégrase, enzyme rétrovirale qui catalyse l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte .....18
3.2.	L'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte se fait grâce à l'intégrase .....19
3.2	Domaines structuraux de l'intégrase de HIV-1 .....20
3.3	Alignement des séquences des motifs DD(35)E des différentes intégrases rétrovirales et transposases bactériennes autour du résidu Glu 152 du site actif de l'intégrase de HIV-1 .....21
5.1	Mécanisme d'action des RDO et des ODN modifiés simple brin .....28

7.1	Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements (1,34 uM ODN) avec les ODN EE34 avec et sans modifications phosphorothioates .....	48
7.2	Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction de la quantité d'ODN utilisée .....	49
7.3	Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements de faible dose (1,34 uM d'ODN) appliqué une fois par semaine .....	51
7.4	Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements avec et sans mixte d'ODN mutagène avec un ratio ODN : liposome de 1,5 : 1 pour le mixte des 3 ODN avec 1,01 uM chacun, un ratio 1 : 1 pour les traitements avec 1,34 uM et 0,67 uM.....	52
7.5	Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements avec un mixte d'ODN mutagènes avec un ratio ODN : liposome de 1 : 1 .....	53
7.6	Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par test rAdT. Cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes et cultivées après le 6 <sup>e</sup> traitement hebdomadaire de 1,34 uM. Le contrôle positif est le surnageant des cellules NIH NE8 sans traitement .....	54
7.7	Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par test rAdT. Cellules NIH NE8 traitées selon différentes doses d'ODN. Le contrôle positif est le surnageant des cellules NIH NE8 sans traitement .....	55
8.1	Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées à différents temps post-infection avec 1,34 uM des différents ODN .....	56
8.2	Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le Virus Cas-Br-E et traitées à différents temps post-infection (1,34 uM ODN) .....	57

8.3	Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées à différent temps post-infection (1,34 uM ODN) avec des répétitions de traitements .....	58
8.4	Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées à différent temps post-infection selon différentes doses d'ODN (1,34 uM et 4,02 uM) .....	59
9.1	Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par rAdT. Infection de cellules NIH 3T3 avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes, une fois par semaine, durant 6 semaines avec 1,34 uM et cultivées après le dernier traitement pendant 75 jours.....	60
9.2	Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 ayant été infectées avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes, une fois par semaine, durant 6 semaines avec 1,34 uM et cultivées après le dernier traitement pendant 75 jours.....	61
10.1	Analyse de l'ARN des cellules traitées aux ODN par RT-PCR. a) Amorces IN b) Amorces Actine .....	64
10.2	Analyse des protéines totales des cellules traitées aux ODN par Western blot.....	65
11.1.	Alignement des séquençages directs des produits de PCR avec chacun des ODN mutagènes .....	67
11.2	Chromatogrammes des séquençages directs des produits de PCR démontrant un mélange d'ADN sauvage et muté. a ) PCR-574-10 amorces CasIN-1, b) PCR-574-10 amorces CasIN-49 c) PCR d'ADN de type sauvage .....	69
11.3	Chromatogrammes des séquençages directs des produits de PCR démontrant des zones d'ambiguïté. a) PCR-574-3 b) PCR d'ADN de type sauvage .....	70
11.4	Chromatogrammes des séquençages directs des produits de RT-PCR. Présence d'un mélange d'ADN sauvage et muté a) RT-PCR-581-4 b) RT-PCR-581-5 c) RT-PCR-581-11 d) PCR d'ADN de type sauvage .....	71

11.5	Chromatogrammes des séquençages directs des produits de RT-PCR a) RT-PCR-585-2 b) PCR d'ADN de type sauvage .....	72
11.6	Chromatogrammes des séquençages directs des produits de RT-PCR a) RT-PCR 581-19 b) PCR d'ADN de type sauvage .....	73
11.7	Chromatogramme des séquençages des clones obtenus par clonage dans le vecteur pDrive du PCR de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE34 avec une dose de 1,34 uM une fois par semaine, durant 5 semaines. a) clone 430-T7 b) clone 428-sp6 c) clone 426-T7 d) clone 429-T7 e) PCR d'ADN de type sauvage .....	74
11.8	Chromatogramme des séquençages des clones obtenus par clonage dans le vecteur pDrive du PCR de l'ADN des cellules NIH 3T3 infectées par les virus Cas-Br-E et traitées 5 fois à toutes les semaines avec 1,34 de l'ODN EE32. a) clone AS17-A5-18-T7 b) PCR d'ADN de type sauvage .....	76

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Inhibition de la production virale en fonction de la quantité d'ODN EE34 et de liposome (Lipofectamine 2000) utilisée sur des cellules NIH NE8 .....	46
II. Effet inhibiteur des ODN mutagènes déterminé par les $IC_{50}$ de chacun d'eux en fonction des régions ciblées et de leur mode d'action .....	50

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : Abacavir  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATL : « Adult T-cell Leukemia » (leucémie/lymphomes-T de l'adulte)  
AZT : Zidovudine  
CA : Capside  
CS: Calf sérum  
CD4+ : « Cluster of Differentiation 4 positive »  
Da : Dalton  
DDE : Acide Aspartique, Acide Aspartique, Glutamine  
d4T : Stavudine  
ddC : Zalcitabine  
ddI : Didanosine  
FBS : Fetal bovine serum  
FFU : « Foci Forming Unit »  
HAART : « Highly Active Antiretroviral Therapy » (Thérapie anti-rétrovirale hautement active)  
HHCC : Histidine, Histidine, Cystéine, Cystéine  
HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus type 1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ou VIH-1)  
HTLV-I : « Human T-cell Leukemia Virus Type I »  
IN : Intégrase  
INF- $\alpha$  : Interféron alpha  
IR : « Inverted Repeat »  
LB: Luria Bertani  
LTR : « Long Terminal Repeat »  
M : Molaire  
MA : « Matrix Protein »

MLV : Moloney Murine Leukemia Virus (virus de la leucémie murine Moloney)

MMR : Mismatch Repair Pathway (voie de réparation des méssapariments)

MuLV : Murine Leukemia Virus (virus de la leucémie murine)

NER : Nucleotide Excision Repair Pathway (voie de réparation par excision de nucléotide)

NIH 3T3 : « Embryo, Contact-Inhibited, NIH Swiss Mouse Cell Line »

NIH NE8 : Cellules NIH 3T3 infectées chroniquement par le rétrovirus Cas-Br-E

NNRTI : Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse)

NRTI : Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse)

NTRTI : Inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse

ODN : Oligodéoxynucléotide

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PBS : « Primer Binding Site »

PI : Protease Inhibitor (inhibiteur de protéase)

PIC : Preintegration Complex (complexe de préintégration)

PR : Protéase

Ps : Phosphorothioate

P/S : Pénicilline/Streptomycine

RDO : Chimeric RNA/DNA Oligonucleotide (oligonucléotide chimérique ADN/ARN)

RT : Reverse Transcriptase (transcriptase inverse)

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SNC : Système nerveux central

SU : Glycoprotéine de surface de l'enveloppe virale

TCR : Transcription-Coupled Repair (réparation liée à la transcription)

TM : Protéine TransMembranaire de l'enveloppe virale

TSP/HAM : Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesy/ (paraparésie spastique tropicale/myélopathie)

3TC : Lamivudine

## RÉSUMÉ

Les rétrovirus humains tels que HTLV-I (Human T-cell Leukemia Virus) et HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1) sont associés à des pathologies mortelles et sont largement répandus à travers le monde. Actuellement, aucun vaccin ni thérapie ne sont disponibles pour prévenir ou enrayer totalement l'infection par ces virus. Le but du présent projet est de développer une nouvelle approche anti-rétrovirale se basant sur l'altération de l'ADN viral intégré dans le génome de la cellule hôte. Nous avons utilisé comme modèle le rétrovirus de la leucémie murine (MuLV) Cas-Br-E. Ce virus induit des leucémies non B et non T et engendre une maladie neurologique spongiforme chez certaines souches de souris. La cible du traitement est l'intégrase (IN), une enzyme clé du cycle réplcatif. Elle catalyse l'intégration de l'ADN du virus dans le génome de la cellule de l'hôte et est également impliquée dans la transcription inverse, le transport de l'ADN viral dans le noyau et l'assemblage des particules virales. Les traitements, des ODN mutagènes de l'IN, sont conçus de manière à introduire une mutation au début de la séquence codante de l'IN, engendrant ainsi la production de particules virales défectives et non infectieuses.

Les expérimentations se sont effectuées en deux volets : avec le traitement de cellules NIH NE-8 chroniquement infectées par Cas-Br-E et, ensuite, avec celui de cellules NIH 3T3, infectées par Cas-Br-E et traitées à différentes périodes post-infection. L'impact des traitements a été déterminé par titration des virus produits en immunofluorescence, dosage de la transcriptase inverse et séquençage des produits de PCR des ADN et ARN des cellules traitées.

Les résultats obtenus avec les ODN mutagènes montrent une diminution de la production de virus infectieux en fonction du nombre de traitements, de la dose utilisée et du moment où les traitements ont été effectués. Une inhibition totale de la production virale est possible avec l'utilisation d'une seule dose massive de 4,0  $\mu$ M ou d'une faible dose de 1,34  $\mu$ M ciblée en début d'infection, soit dans les 4 premiers jours. Des mutations du génome ont été observées au niveau de l'ADN et de l'ARN des cellules traitées. En conclusion, la diminution de la production de virus infectieux, suite aux traitements, permet d'envisager l'utilisation de cette stratégie comme nouvelle thérapie contre les infections par HIV-1 et HTLV-I, d'autant plus qu'une fois la production de virus infectieux enrayerée totalement, l'inhibition se maintient dans le temps.



## **PARTIE INTRODUCTIVE**

### **Chapitre I**

#### **Problématique**

Actuellement, il n'existe aucun vaccin pour se prémunir ou de thérapie pour éradiquer les infections engendrées par les rétrovirus pathogènes chez l'humain. Une origine rétrovirale est reconnue pour plusieurs cancers chez les animaux. Le rétrovirus HTLV-I, le premier rétrovirus humain pathogène découvert, est étiologiquement lié à la leucémie des cellules T chez l'adulte (ATL), une leucémie aiguë et très souvent fatale chez l'adulte (Kuefler et Bunn, 1986). Le virus est aussi associé à la myélopathie/paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP). Cette forme d'affection se caractérise par une pathologie neurologique chronique dans laquelle une paralysie des membres inférieurs, de même que divers troubles sensitifs, font progressivement leur apparition (Gessain et *al.* 1985, Rodgers-Johnson et *al.* 1985 et Osame et *al.* 1986).

L'ATL, dans sa forme leucémique ou lymphomateuse, est un cancer très agressif, d'évolution rapide, qui emporte généralement le malade en quelques mois. Une résistance à la chimiothérapie est observée dans pratiquement tous les cas. Certaines personnes souffrent aussi de formes chroniques, bien que le taux de cellules leucémiques soit élevé, la maladie peut malgré cela rester stable durant un certain temps. Divers essais associant chimiothérapie, antiviraux et immunothérapie n'ont, à l'heure actuelle, pas été concluants. De même, les essais d'association d'immunomodulateurs, de corticothérapie et d'antiviraux dans les TSP/HAM n'ont apporté qu'une amélioration clinique transitoire et se limitant au court terme (Mahieux et Gessain, 2003 et Hermine et *al.*, 2002).

Cependant, pour d'autres rétrovirus, les premières manifestations ne sont pas de type cancérogène. En effet, plutôt que d'engendrer une prolifération désorganisée des cellules infectées comme le font les rétrovirus oncogènes, certains rétrovirus détruisent les cellules. C'est le cas du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1). Le virus HIV-1 est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Le SIDA se

caractérise par un échec progressif du système immunitaire à combattre diverses infections. Ces dernières finissent par entraîner le développement de pathologies mortelles (Lawn et *al*, 2001).

Les thérapies anti-rétrovirales hautement actives (HAART) ont permis de changer le pronostic des patients atteints du SIDA, mais il n'en demeure pas moins que tant que l'infection perdure, le risque de développer le SIDA demeure. L'arsenal thérapeutique actuel permet de réduire la charge virale à des niveaux indétectables chez certains patients, soit une charge virale plasmatique en-dessous de 50 copies d'ARN viral par millilitre de plasma (Rudich et *al*, 2005). Malgré cette charge virale indiscernable, des cellules réservoirs du HIV-1 persistent, ceci rendant une transmission possible du virus à d'autres individus et permettant l'émergence de nouvelles souches virales résistantes aux traitements. (Pommier et *al*, 2000).

D'autres limitations et inconvénients sont également associés aux HAART, notamment les effets secondaires incluant le développement de pathologies d'ordre métabolique au niveau rénal, cardio-vasculaire et hépatique. De nombreuses études cliniques ont associé les inhibiteurs de protéase de HIV avec des pathologies de dyslipidaémie, de lipodystrophie, de résistance à l'insuline et d'artériosclérose. Une exposition chronique au nelfinavir (un inhibiteur de protéase) induit une diminution de GLUT-4 qui médie le transport du glucose. Ceci engendre l'émergence de voies de signalisation défectives pour l'insuline et qui, à long terme, amène à une résistance à l'insuline. Les inhibiteurs de protéases ont également un effet sur l'adipogénèse, l'apoptose des adipocytes et l'activation de la lipolyse, un désordre qui mène à la lipodystrophie. Ils ont aussi un effet sur la production de radicaux libres, ce qui peut mener à l'artériosclérose (Rudich et *al*, 2005).

Outre l'exposition des patients à des effets secondaires désagréables, il y a également le coût exorbitant des médicaments, les rendant quasi inaccessibles pour les pays en voie de développement, alors que ces derniers sont les plus affectés par le HIV-1. Actuellement, le nombre d'individus infectés par le HIV se situe aux alentours de 40 millions. En dépit des programmes de prévention, 4,8 millions de nouvelles infections ont été recensées en 2003 et ces chiffres continuent d'augmenter d'année en année (Lal et *al*, 2005).

Il y a également émergence de souches virales résistantes aux thérapies. La transcriptase inverse (RT) de HIV-1 ne possède pas de fonction exonucléase de correction, ce qui engendre une variété d'erreurs contribuant ainsi à l'apparition de nouvelles souches

résistantes (Lawn et *al*, 2001). Dès 1989, avec la zidovudine (AZT), première molécule anti-rétrovirale utilisée couramment, plusieurs mutations du virus induisant une résistance au traitement ont été identifiées. Par la suite, des résistances pour toutes les molécules utilisées ont pu être observées dans la pratique courante ou lors d'essais de molécules en cours de développement (Richman, 1993). Ceci fut par la suite observé pour la quinzaine de molécules constituant l'arsenal thérapeutique des HAART contre le HIV (Bossi et *al*, 2001). De plus, ces résistances ont été démontrées autant *in vitro* qu'*in vivo* et une ou plusieurs mutations associées à une résistance phénotypique ont été observées (Richman, 1993).

L'échappement virologique peut être induit par divers mécanismes comme les facteurs pharmacologiques ; mauvaise adhérence des patients au traitement, syndrome de mauvaise absorption, interactions médicamenteuses et manque de puissance du traitement. L'échappement virologique peut également être associé à des mécanismes intrinsèques à la cellule comme, par exemple, la surexpression du gène MDR-1 (Multi-Drug Resistance-1) codant pour une glycoprotéine (P-glycoprotéine), qui engendre une certaine résistance aux substances chimiques traitantes (Bossi et *al*, 2001).

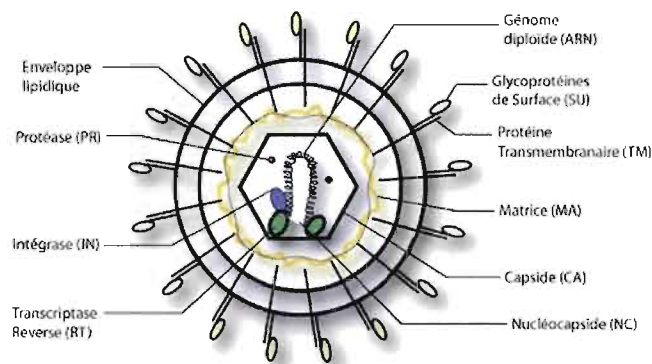
Pour réduire le risque d'émergence de souches résistantes à un médicament en particulier, l'orientation des recherches vers une autre cible s'avère être un choix judicieux. L'intégrase (IN) est une cible intéressante. Elle catalyse l'intégration de l'ADN rétroviral dans l'ADN de l'hôte et est également impliquée dans la transcription inverse, le transport de l'ADN viral dans le noyau et l'assemblage des particules virales. L'IN est donc indispensable à la réplication virale et elle est une enzyme-clé du cycle réplcatif puisqu'il n'en existe aucun autre équivalent cellulaire (Pommier et *al*, 2000).

## Chapitre II

### Les rétrovirus

#### 2.1 Introduction

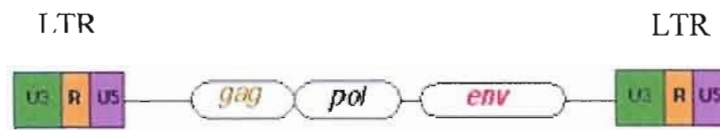
Les rétrovirus sont des virus à ARN à développement cellulaire. Les virions sont sphériques, de symétrie icosaédrique ou en forme de cône tronqué contenu dans une enveloppe sphérique dans le cas du HIV (Prescott et *al*, 1995). Ils sont enveloppés et possèdent un diamètre de 80 à 100 nm. Leur génome consiste en deux molécules d'ARN linéaires simples brins de sens positif. Chacun des monomères, variant de 7-11 kpb, sont reliés de façon non-covalente par des ponts hydrogènes (Fields et *al*, 1996).



**Figure 2.1** Structure d'un virion avec ses diverses protéines et récepteurs de surface.

Le virion (figure 2.1) est composé de protéines dont une glycoprotéine de surface de l'enveloppe virale (SU), un antigène viral majeur responsable de la fixation sur les récepteurs spécifiques. SU est associée à la protéine TM (Trans Membranaire) qui traverse l'enveloppe virale. L'enveloppe lipidique contient les protéines virales et cellulaires. La MA (Matrix Protein) est celle qui se situe à la frontière intérieure de l'enveloppe produite par le gène *gag*. La CA (Capside), codée par *gag*, est la protéine la plus abondante et elle protège le cœur viral. La NC (Nucléocapside) est également codée par *gag* et elle protège quant à elle le génome.

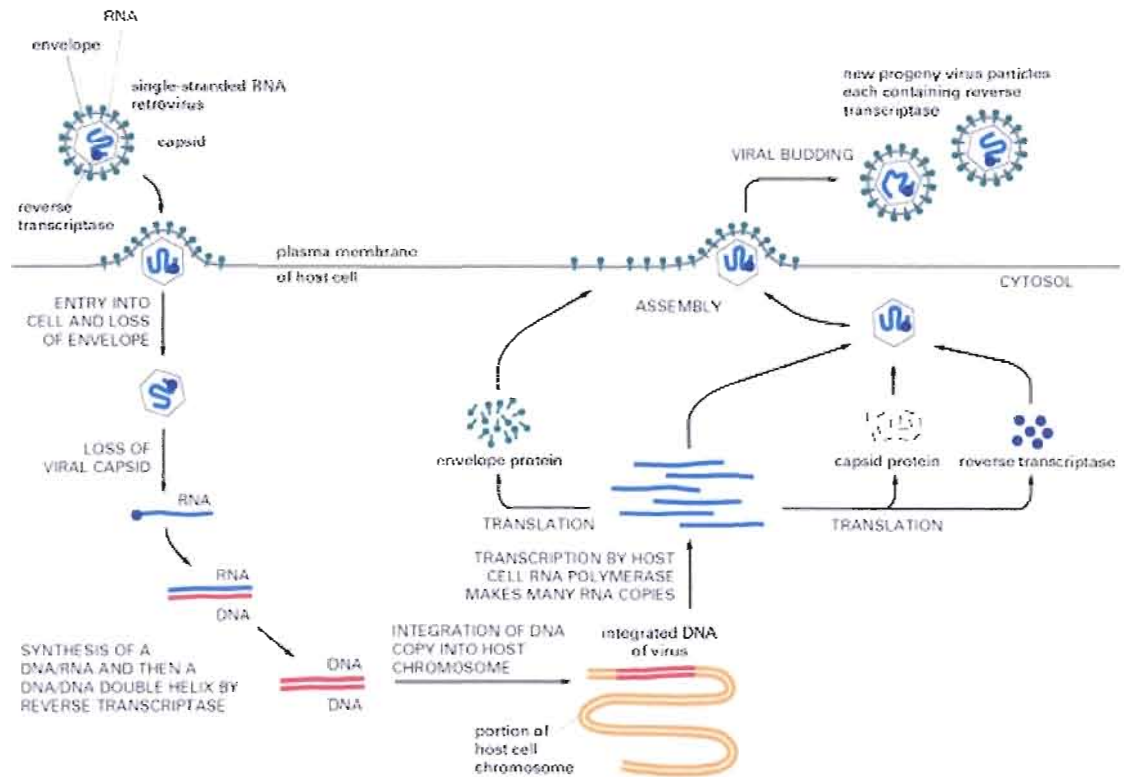
C'est l'assemblage entre l'ARN et la NC, additionnée de quelques protéines, qui vont former le cœur. Ensuite les PR (Protéases), codées par le gène *pol*, interviennent aux premiers clivages de GAG avec certaines protéines de régulation. La RT codée par *pol*, sert à la rétrotranscription de l'ARN viral en un ADNc qui va ensuite s'intégrer et l'IN, codée par *pol*, sert à l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte (Brown, 1997).



**Figure 2.2** Représentation schématique du génome d'un rétrovirus.

Le génome d'un rétrovirus (figure 2.2) est composé de deux LTR (Long Terminal Repeat) et des trois gènes de base *gag*, *pol* et *env*. La région R est une petite région variant de 18 à 250 nucléotides et répétée à chacune des extrémités du LTR. Le U5 constitue la première partie du génome viral à être rétrotranscrite. Les gènes *gag*, *pol* et *env* codent pour les diverses protéines du virion et la région U3 forme l'extrémité 3' de l'ADNc (Brown, 1997).

### 2.1.1 Cycle de réplication des rétrovirus



**Figure 2.3** Cycle de réplication d'un rétrovirus.

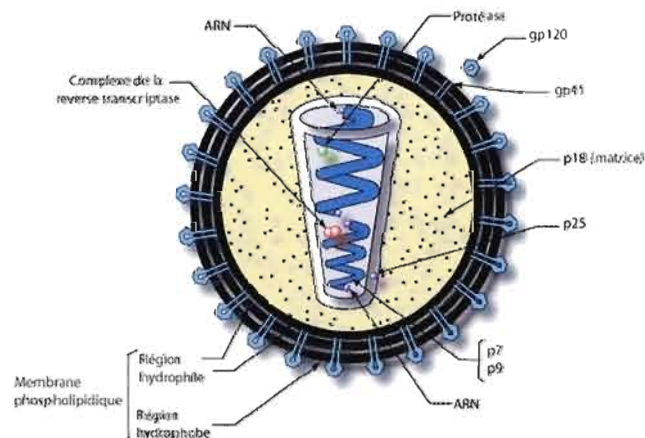
Après la reconnaissance de la cellule cible par le virus, il y a fusion des membranes virales et cellulaires (figure 2.3). Le complexe nucléoprotéique peut alors pénétrer dans la cellule hôte. L'ARN viral simple-brin est alors transcrit en ADN double-brin grâce à la RT. Cet ADN viral pénètre alors dans le noyau cellulaire et s'intègre à l'ADN génomique de la cellule infectée. Il devient alors l'ADN proviral ou provirus et la transcription de l'ADN proviral peut s'opérer. Cette transcription conduit aux ARN viraux génomiques et messagers. Les ARN messagers viraux sont traduits en précurseurs polyprotéiques qui vont ensuite donner les protéines virales, après action, des protéases virales et cellulaires. L'ARN viral associé aux protéines forme un nouveau virion encapsidé. L'élaboration des particules est

suivie du bourgeonnement du virion à la surface de la cellule. Le nouveau virus se détache finalement de la membrane cellulaire et peut alors aller infecter d'autres cellules (Brown, 1997).

## 2.2 Les rétrovirus humains pathogènes

### 2.2.1 Le virus HIV-1

C'est en 1981 qu'ont été mis en évidence les premiers cas d'une nouvelle pathologie, identifiée sous le nom de syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA. Le SIDA fut ensuite associé à certains types de cancers. La principale cellule cible du rétrovirus est le lymphocyte, élément majeur de l'immunité (Pierson et *al*, 2000). Le HIV infecte les cellules  $CD4^+$  (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, etc.) circulant dans le sang mais également dans le liquide céphalorachidien (Vernant et *al*, 1987). Ceci étant différent du virus HTLV-I qui ne se retrouve pas dans le sang (Gessain et *al*, 1985).



**Figure 2.4 Structure du virion de HIV.** La glycoprotéine de surface est la gp120, la protéine transmembranaire est la gp41 (gp160 est clivée en gp41 et gp120) ; la matrice est la p18. La nucléocapside est formée de p7 et p9 ou p25.





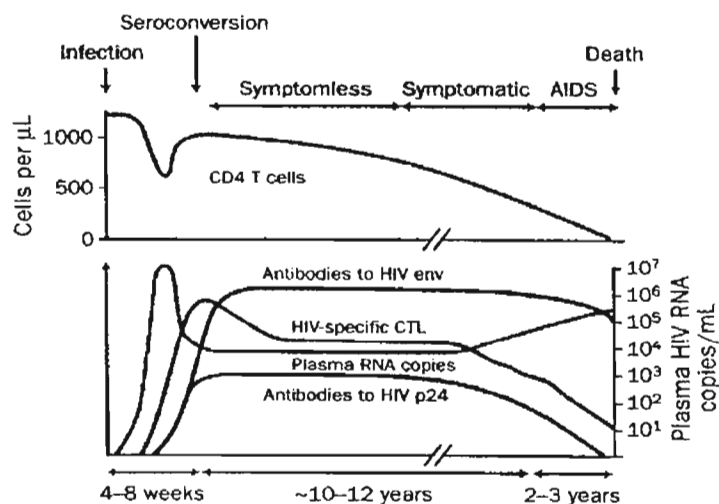


aussi une probabilité de contamination materno-fœtale par le passage du sang d'une femme séropositive à son enfant *in utero* ou pendant l'accouchement. Le nouveau-né peut aussi être contaminé par le lait maternel. Toutefois, le virus ne se trouve en grande quantité que dans le sang et dans le sperme. On peut aussi le retrouver, quoique rarement et en faible quantité, dans la salive, les larmes, les urines et les selles (Janeway et *al*, 2001).

L'organisation mondiale UNAIDS estime à plus de 37,8 millions le nombre d'individus infectés par le HIV actuellement dans le monde, près de 70 % des cas se situent en Afrique et en Asie (Lal et *al*, 2005). Au Canada, 18 124 cas cumulatifs de SIDA chez des adultes avaient été signalés en date du 30 juin 2002 au Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses (CPCMI). De ce nombre, 7,9 % des cas relevés étaient des femmes. La proportion des cas de SIDA dans la population féminine a d'ailleurs augmenté au fil du temps, passant de 5,6 % avant 1992 à 8,3 % en 1995 et culminant à 16,4 % en 1999. Parmi tous les cas cumulatifs de SIDA signalés chez les femmes, 67,4 % étaient attribués à des contacts hétérosexuels, 22,9 % à l'injection de drogues et 9,5 % à la transfusion de sang et de produits sanguins (Santé Canada, 2002). Au Québec, la maladie est en constante progression : on estime qu'environ 15 000 personnes seraient actuellement porteuses du VIH et que plus de 4 500 personnes en seraient décédées.

Le SIDA représente la phase ultime de l'infection par le HIV et se caractérise par son aspect pléiotropique et son évolution mortelle. L'évolution de la pathologie permet de distinguer trois groupes de patients; le premier groupe correspond aux patients asymptomatiques, le deuxième correspond à ceux qui ont des manifestations mineures (telles que des dermites séborrhéiques, candidoses oro-pharyngée, zona, herpès, leucoplasie orale chevelue etc.). Le troisième groupe correspond aux malades présentant des manifestations majeures définissant le SIDA. Ces manifestations sont nombreuses, essentiellement de nature infectieuse et atteignent surtout les poumons, le cerveau et le tube digestif. Il y a également des manifestations malignes qui, selon leur nature, apparaissent au niveau du système lymphatique, de la peau ou du col de l'utérus (Levine et *al*, 2001). Les seuls cancers définissant le SIDA sont les lymphomes de Burkitt, les lymphomes à grandes cellules (dont les immunoblastes), les lymphomes primitifs cérébraux, le sarcome de Kaposi et le cancer invasif du col de l'utérus (Baillargeon et *al*, 2004). Ces différents groupes ne se succèdent pas nécessairement et un patient peut passer directement du premier au troisième groupe.

À la suite de la pénétration du virus dans l'organisme apparaît une phase de réplication intense, avec une charge virale plasmatique extrêmement importante et un envahissement des ganglions lymphatiques (figure 2.6). Cette phase de primo-infection peut passer inaperçue, bien qu'elle s'accompagne souvent de manifestations assez remarquables (fièvre, céphalées, éruption cutanée, adénopathies, douleurs musculaires et articulaires). Dès lors, la personne contaminée peut à son tour en contaminer une autre. L'infection par le HIV est ensuite marquée par une diminution progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui sont ses cibles privilégiées, de même que d'autres cellules, tels que les macrophages. Au fil du temps, le virus infecte un nombre grandissant de cellules et contribue, directement ou indirectement, à la disparition progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> engendrant l'augmentation du déficit immunitaire. En une dizaine d'années, le patient sera profondément immunodéprimé et sera alors susceptible de développer une ou des manifestations sévères définissant le SIDA. Ces complications, quelle qu'en soit la nature, sont remarquables par leur gravité, leur caractère récidivant et leur évolution fatale (Lawn et *al*, 2001).



**Figure 2.6** Cinétique de l'infection par HIV. Évolution de la quantité de cellule CD4<sup>+</sup> de même que des anticorps cours de l'infection par HIV en fonction du nombre de copie d'ARN viral/mL.

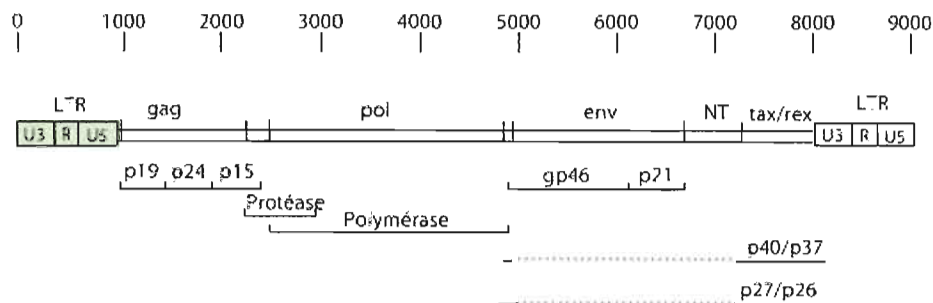
Depuis 1996, la trithérapie, association de deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI) à un inhibiteur de protéase (PI), a été la combinaison la plus prescrite (Bossi et *al*, 2001). Son efficacité a été démontrée par de nombreuses études et ces

résultats sont dépendants de la charge virale du patient (Gulick et *al*, 1997 et Hammer et *al*, 1997). La trithérapie nucléosidique est associée à une nette régression de la mortalité et de la morbidité des patients infectés par le HIV. Une étude a démontré que la trithérapie nucléosidique comportant la zidovudine (AZT), la lamivudine (3TC) et l'abacavir (ABC) peut réduire la charge virale sous la barre des 50 copies d'ARN viral par millilitre de plasma chez environ 56 % des personnes vivant avec le HIV (Bossi et *al*, 2001). Cependant, aucune thérapie actuelle n'élimine complètement le virus.

### 2.2.2 Le virus HTLV-I

Le virus HTLV-I, découvert par Poiesz et *coll.* en 1980, est l'agent responsable d'un lymphome à lymphocytes T de l'adulte (ATL). Actuellement, plus de 15 millions de personnes sont infectées (Shtalrid et *al*, 2005). L'infection à HTLV-I est endémique dans le sud-ouest du Japon, le bassin de la Caraïbe, l'Afrique intertropicale, la partie Nord-Est de l'Amérique du Sud et certaines régions d'Océanie (Nouvelle-Guinée). La prévalence est de l'ordre de 2 à 3% en Martinique et en Guadeloupe et de 6% en Jamaïque (Bazarbachi et *al*, 2004). Dans les zones d'endémie, des taux de prévalence atteignant 15 % ont été signalés dans l'ensemble de la population (Oger et *al*, 1993). Plus encore, dans le district de Kyushu, au Japon, la séroprévalence atteints les 30 % dans la population adulte (Shtalrid et *al*, 2005).

Le HTLV-I possède les trois gènes indispensables à la synthèse de ses protéines de structure (*gag*, *pol*, *env*), ainsi qu'une région pX codant pour des protéines régulatrices, Tax et Rex. Cependant, il diffère du HIV dans sa structure morphologique et génétique. Le gène *gag* code pour les protéines du centre p15, p19 et p24, le gène *pol* code pour la transcriptase inverse et l'intégrase et le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe gp21 et gp46 (figure 2.7).



**Figure 2.7** Représentation schématique du génome du virus HTLV-I.

Tax, qui code pour une protéine de transactivation de 40 kDa, p40x, contrôle l'expression virale et interfère avec le métabolisme cellulaire en stimulant ou inhibant de nombreux gènes. Tax jouerait également un rôle dans l'immortalisation des cellules infectées et donc dans l'apparition du lymphome (Gatza et *al*, 2003). La protéine Rex est une phosphoprotéine nucléolaire de 189 acides aminés. Contrairement à Tax, Rex ne régule pas la transcription virale mais les mécanismes post-transcriptionnels. Rex augmente l'expression des protéines virales structurales et enzymatiques en facilitant le transport dans le cytoplasme des messagers génomiques et mono-épissés. En l'absence de Rex, ces messagers demeurent dans le noyau pour subir d'autres épissages ou être dégradés. Rex, qui peut s'autoréguler négativement, inhibe indirectement l'expression du messageur bi-épissé codant Tax-1, jouant ainsi un rôle important dans l'établissement et le maintien de la latence virale (Narayan et *al*, 2001).

La séroprévalence augmente avec l'âge (Oger et *al*, 1993) et l'infection touche environ deux fois plus de femmes que d'hommes. Elle est plus importante chez les Noirs et les Asiatiques que chez les Blancs. Le taux de séroprévalence de HTLV-I/II chez les donneurs de sang volontaires en Europe est de 1 pour 20 000. Aux États-Unis, les taux s'établissent en moyenne à 0,05 %, soit 3 fois plus qu'en Europe (Bazarbachi et *al*, 2004). Au Canada, quatre cas de paraparésie spastique tropicale/myélopathie (TSP/HAM) associée au HTLV-I avaient été découverts chez des Autochtones de la Colombie-Britannique en 1993 (Oger et *al*, 1993). Depuis cette découverte, les données recueillies indiquent que l'infection clinique par le

HTLV-I n'est pas fréquente dans cette région et aucun nouveau cas n'a récemment été répertorié (Santé Canada, 1995).

Le virus HTLV-I est transmissible par des voies similaires à celle du HIV-1, soit de la mère à l'enfant, mais surtout durant l'allaitement maternel, les contacts sexuels, les transfusions sanguines et l'échange d'aiguilles contaminées. Dans les pays endémiques, la voie de transmission de la mère à l'enfant est importante : 15 à 20 % environ des enfants de mère infectée sont à leur tour infectés, majoritairement lors d'un allaitement prolongé. La transmission par voie sexuelle existe, majoritairement de l'homme à la femme. La prévalence de l'infection est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Oger *et al*, 1993).

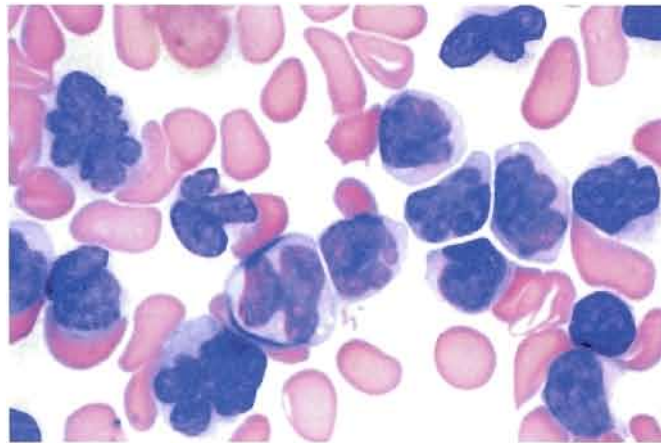
L'infection des lymphocytes CD4<sup>+</sup> par le HTLV-I se fait en deux phases distinctes : soit une première phase horizontale durant laquelle se produit l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, ceci correspondant à la phase polyclonale et une seconde phase, verticale, qui se caractérise par une expansion clonale (Mahieux et Gessain, 2003). L'infection est le plus souvent asymptomatique : seuls 1 à 5% des sujets infectés développent une symptomatologie.

Les maladies associées à ce virus sont le lymphome/leucémie des cellules T de l'adulte (ATL) et une neuropathie dégénérative chronique (Yoshida *et al*, 1984), la paraparésie spastique tropicale/myélopathie associée au HTLV-I (TSP/HAM) (Gessain *et al*, 1985 / Osame *et al*, 1986). D'autres infections peuvent faire partie de l'éventail de maladies associées au HTLV-I, notamment la polymyosite, l'arthropathie chronique, la panbronchiolite et l'uvéite. On estime que l'ATL atteint 2 à 4 % des personnes infectées par le HTLV-I dans les régions où ce virus est endémique et où les jeunes enfants sont fréquemment infectés. Ce sont les personnes de 40 à 60 ans qui sont les plus souvent touchées, ceci s'expliquant par le fait que le virus peut être latent pendant des dizaines d'années avant que la maladie ne se manifeste (Oger *et al*, 1993 et Mortreux *et al*, 2003). Environ de 3 à 5 % des personnes infectées par le HTLV-I souffrent des manifestations neurologiques de l'infection (Edlich *et al*, 2000) et la période de latence est plus courte dans le cas de la leucémie (Oger *et al*, 1993).

L'ATL survient de 20 à 30 ans après l'infection et de façon polymorphe ; leucose aiguë, leucémie chronique et lymphome. La prolifération maligne atteint les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Le pronostic de survie dans la forme aiguë est en moyenne de 6 mois. L'ATL se manifeste par une augmentation du volume des ganglions lymphatiques (adénopathies), une

hépatomégalie et des lésions de la peau. Une hypercalcémie engendrant une augmentation du nombre d'ostéoblastes et l'apparition de lésions osseuses est également fréquente. Le nombre de lymphocytes anormaux (figure 2.8) dans le sang arborant un noyau profondément échancré à plusieurs lobes augmente.

L'affection nerveuse liée au HTLV-I est une paralysie des membres inférieurs de l'adulte qui s'aggrave progressivement (Mortreux et *al*, 2003). Les troubles reliés à la paraparésie spastique (TSP), qui surviennent moins de 5 ans après l'infection, (principalement après transfusion sanguine) se caractérisent par une contracture des membres inférieurs entraînant la paralysie, des troubles du sphincter et des troubles sensitifs y sont associés. Ces manifestations sont engendrées par les lésions des faisceaux pyramidaux du cerveau. Une démyélinisation et des lésions axonales caractérisent l'atteinte de la moelle épinière. Quelques cas d'infections lymphocytaires avec inflammation au niveau du système nerveux central (SNC) ont été décrits (Mahieux et Gessain, 2000).



**Figure 2.8 Cellules du sang infectées par HTLV-I.** Lymphocytes anormaux à noyau échancré à plusieurs lobes donnant un aspect de fleur aux cellules. (Tiré de Bazarbachi et *al*, 2004).

Actuellement, aucun traitement efficace n'est disponible pour traiter ou prévenir les affections liées à HTLV-I. Une combinaison d'AZT et d'IFN- $\alpha$ , a démontré avoir un effet sur les lymphocytes T des patients atteints de l'ATL (Bazarbachi et *al*, 1997). Plus récemment, des essais *in vitro* ont démontré que l'utilisation de fortes doses d'inhibiteur de protéase PS-341,

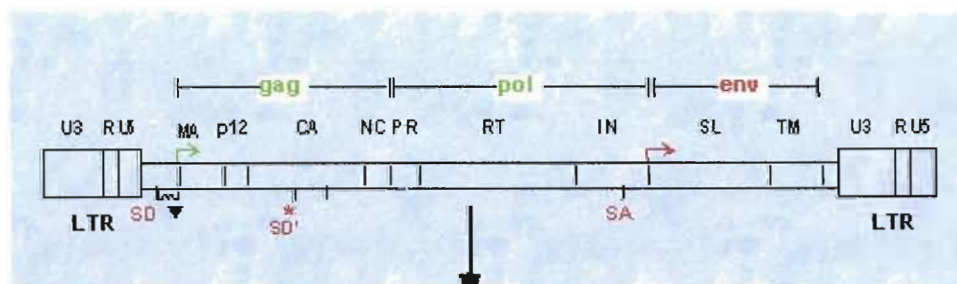


combinées au doxorubicin ou à l'ectoposide, ont permis une augmentation d'induction de l'apoptose des cellules T infectées par HTLV-I (Nasr et *al*, 2005). À l'heure actuelle, une nouvelle approche thérapeutique rappelant celle des HAART est utilisée pour le traitement des affections liées à HTLV. Elle est constituée d'une combinaison d'AZT, d'interféron-alpha (INF- $\alpha$ ) et de diverses molécules telles que le tioxide d'arsenic, des inhibiteurs de protéase, des rétinoïdes et des inhibiteurs de l'angiogénèse (Bazarbachi et *al*, 2004). Cependant, rien n'est encore gagné et les effets secondaires de ces divers traitements sont extrêmement éprouvants (Hermine et *al*, 2002).

## 2.3 Le rétrovirus de la leucémie murine

### 2.3.1 Le virus Cas-Br-E

Le Cas-Br-E MuLV (figure 2.9), un modèle rétroviral animal bien étudié en laboratoire, peut servir de modèle pour les rétrovirus humains. Comme le virus HTLV-I, il induit deux pathologies distinctes : des leucémies et une maladie chronique progressive. Cas-Br-E est le rétrovirus écotropique neurovirulent le plus étudié à ce jour (Lynch et Sharpe, 2000). Il fut découvert en 1973 par l'équipe de Gardner chez des souris sauvages vivant autour du Lac Casitas, d'où son nom (Gardner et *al*, 1973). La transmission de la maladie est verticale et dans sa forme sauvage, le virus est transmis aux nouveau-nés par le lait maternel, induisant alors une infection s'échelonnant tout au long de leur vie avec une virémie persistante. Il se transmet également sexuellement. Les signes cliniques peuvent cependant mettre plus d'un an avant de se manifester. Pour cette raison, Cas-Br-E a été classé dans le groupe des virus lents (Portis et *al*, 1987).



**Figure 2.9** Représentation schématique du rétrovirus de la leucémie murine.

Expérimentalement, il est possible de transmettre le virus à des souris par une injection intra-péritonéale de  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  FFU du rétrovirus à des souriceaux (âgés de deux jours) de souches susceptibles (NIH/Swiss, CFW/D, SWR/J, SIM.S et CH3). Les inoculations intra-péritonéales ou intra crâniennes du virus induisent une maladie neurologique avec une période de latence similaire (Czub et *al*, 1991). Ceci implique que la dose du virus a un effet dans les tissus périphériques plutôt que dans les tissus neuronaux (Czub et *al*, 1992). Il est reconnu depuis longtemps que l'induction de la maladie neurologique dépend de la période d'inoculation (Czub et *al*, 1991). Cette restriction intrinsèque à l'âge est indépendante du système immunitaire et ne peut être contournée par une inoculation directe du virus ou des cellules productrices du virus directement dans le cerveau. Ceci suggère une caractéristique intrinsèque des stades de développement du SNC lui-même.

L'apparence et la sévérité des signes cliniques et lésions engendrés sont en corrélation avec la quantité de virus Cas-Br-E dans le SNC (Czub et *al*, 1992). Cependant, la neurodégénérescence ne peut pas survenir si les souris infectées par le virus sont âgées de plus de deux semaines, peu importe la quantité de virus inoculée (Lynch et Portis, 1993). Les premiers éléments à être atteints ne sont pas les neurones moteurs, ce qui indique que la maladie neurologique est médiée par un mécanisme indirect. La transplantation de microglies infectées par Cas-Br-E dans le CNS est suffisante pour induire une neuropathie spongiforme. Des analyses génétiques de cartographie ont démontré que les déterminants primaires pour la neurovirulence résident dans le gène *env*. Les études ont montré la possibilité qu'une unique protéine neurotoxique, Env, est générée durant l'infection microgiale (Lynch et Sharpe, 2000).

Histopathologiquement, la maladie neuronale est caractérisée par une myéloencéphalopathie spongiforme, avec une gliose intense se situant principalement dans les membres antérieurs de la corde spinale lombosacrale, certaines régions du cerveau et le noyau profond du cervelet (Gardner, 1973 et Kay et *al*, 1991). L'infection du SNC par Cas-Br-E se traduit par un changement vacuolaire des aires motrices du cortex et de la corde spinale. Les premières manifestations cliniques résultent en une paralysie spastique tremblotante des membres postérieurs, progressant ensuite vers les membres supérieurs et menant à la mort (Czub et *al*, 1992).



Cas-Br-E est également leucémogène car il induit une variété de tumeurs des cellules hématopoïétiques en fonction des souches de souris utilisées (Bergeron et *al*, 1993). Ainsi, son injection chez des souris NFS/N engendre des lymphomes pré-B et pré-T, des érythroleucémies et des leucémies mégacaryocytaires et myéloïdes. Cependant, l'injection de ce virus à des souris NIH-Swiss induit majoritairement une leucémie non B et non T, composée de cellule immature, avec aucun marqueur myéloïde ou lymphoïde (Fredrickson et *al*, 1984).

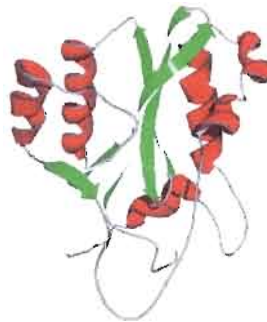
Ainsi, tout comme le HTLV-I, Cas-Br-E induit à la fois des pathologies neurologiques et des leucémies. Cas-Br-E constitue donc un bon modèle pour étudier l'effet inhibiteur d'ODN mutagène sur la propagation de l'infection rétrovirale et le développement des pathologies qui y sont associées. De plus, avec l'utilisation du Cas-Br-E, il sera possible d'effectuer des essais *in vivo* sur des souris, ceci étant impossible dans nos laboratoires pour les rétrovirus HIV et HTLV.

## Chapitre III

### L'intégrase

#### 3.1 Introduction

Quelle que soit la complexité des rétrovirus, l'infection des cellules fait intervenir une étape clé et indispensable dans le cycle viral, soit l'intégration de l'ADN virale, obtenu après rétrotranscription, dans l'ADN de la cellule hôte. Cette réaction capitale du cycle de réplication des rétrovirus est catalysée par l'intégrase (figure 3.1). Cette dernière est strictement indispensable à la réplication virale (Deprez et Mouscadet, 2002) et, de plus, il n'existe aucun autre équivalent cellulaire (Pommier et *al*, 2000).

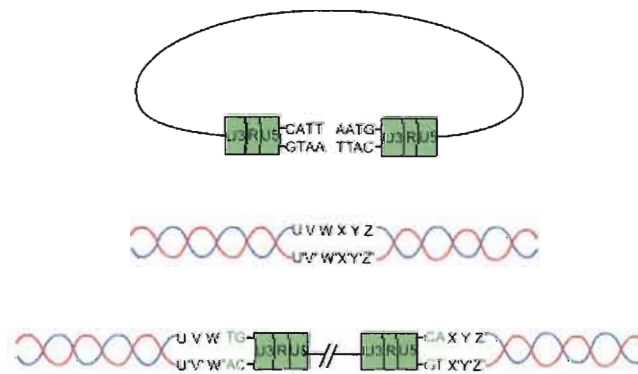


**Figure 3.1** L'intégrase, enzyme rétrovirale qui catalyse l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte.

##### 3.1.1 Mécanisme de l'intégration

L'intégrase rétrovirale reconnaît des séquences spécifiques, dans le LTR, répétées à chaque extrémité de l'ADNc viral (Brown, 1997). Les 15 dernières paires de bases du LTR sont nécessaires pour la reconnaissance du site spécifique de clivage et d'intégration. Une région riche en GA en amont du site de clivage est essentielle pour l'activité de l'enzyme. L'intégrase catalyse deux réactions indépendantes et successives. La première étape de la réaction d'intégration (« 3' processing ») consiste en l'élimination de deux nucléotides à chaque extrémité pour produire de nouvelles extrémités 3'-hydroxyl (CA-3'-OH) (Bushman et Craigie, 1991). Cette étape se produit au niveau du cytoplasme, à l'intérieur d'un complexe

nucléoprotéique, constituant le complexe de préintégration (PIC). La deuxième étape (« Strand Transfer ») se produit après l'entrée du PIC dans le noyau, l'ADN viral se joignant avec l'ADN de l'hôte. La réaction de jonction requiert la coordination de 4 à 6 pb de l'ADN de l'hôte et la ligation de l'extrémité CA-3' OH de l'ADN viral à l'extrémité 5' phosphate à l'ADN cible (Bushman et *al*, 1990) (figure 3.2).

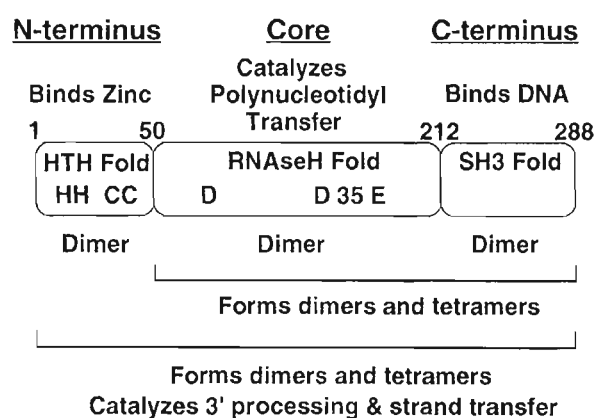


**Figure 3.2.** L'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte se fait grâce à l'intégrase.

### 3.1.2 Caractéristique de l'intégrase rétrovirale

L'intégrase est codée par le gène *pol*. La protéine intégrase varie en taille (de 288 à 409 acides aminés) et en séquence chez les rétrovirus. Elle comporte cependant trois domaines fonctionnels chez tous ces virus soit le N-terminal, le domaine central et le C-terminal. Le domaine N-terminal, caractérisé par une structure histidine-histidine-cystéine-cystéine (HHCC), un motif en pseudo doigt de zinc. La fixation du zinc induirait l'oligomérisation de l'intégrase, conduisant à un complexe multimérique actif (Deprez et *al*, 2000). Cette région est nécessaire aux interactions protéine-protéine et contribue à la reconnaissance spécifique des extrémités de l'ADN (De Soultrait et *al*, 2002). Le domaine central, relativement résistant aux protéases, contient un trio de résidus acides qui forme le motif DD(35)E qui se retrouve dans toutes les intégrases rétrovirales et qui est responsable de l'activité catalytique. Ce domaine est présent également sur de nombreux éléments transposables (Ey et *al*, 1997). Une mutation sur

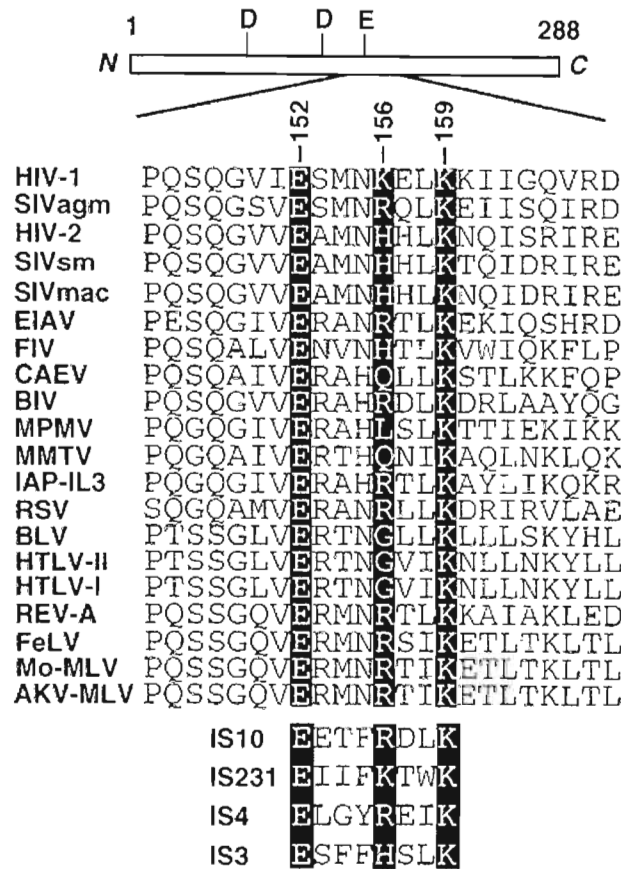
un de ces résidus inhibe totalement l'activité catalytique de l'enzyme (Wu et *al*, 1999 et Cherepanov et *al*, 2000). Le domaine C-terminal, quant à lui, possède une activité de fixation à l'ADN de caractère non spécifique (Brown, 1997) et ce domaine carboxyl-terminal est le moins conservé (De Soultrait et *al*, 2002). Le domaine C-terminal, en conjonction avec le domaine N-terminal, jouerait un rôle au niveau de la multimérisation (Ey et *al*, 1997). *In vitro*, l'intégrase recombinante purifiée catalyse les deux étapes de la réaction d'intégration ainsi que la réaction inverse d'excision (Brown, 1997).



**Figure 3.3 Domaines structuraux de l'intégrase de HIV-1.** L'intégrase est composé de 3 domaines fonctionnels qui contiennent des séquences d'acide aminé conservé dans le domaine N-terminal (motif HHCC) et dans le domaine central (motif DD(35)E). (Tiré de Jenkins et *al*, 1997).

Les analyses structurales du domaine central ont révélé que l'intégrase est structurellement reliée à la superfamille des polynucléotidyles transférases (Dyda et *al*, 1994). Cela suggère que l'intégrase rétrovirale partage des réactions chimiques similaires avec certaines nucléases et polymérases cellulaires. Le domaine C-terminal possède une conformation topologique SH3 lui permettant de se lier à l'ADN. La structure isolée du domaine N-terminal est similaire au répresseur Trp : elle se lie à l'ADN par un domaine en hélice tournée (Jenkins et *al*, 1997). La séquence primaire de la protéine présente du côté N-terminal possède un motif très conservé de type HHCC (figure 3.3). Comparées aux caractéristiques canoniques des motifs en doigt de zinc, celles de l'intégrase diffèrent sur trois points : l'orientation est HHCC au lieu de CCHH, la boucle liant la séquence H à la séquence

C apparaît particulièrement longue (23 acides aminés) et, enfin, le motif est unique (Dyda et *al*, 1994). Les trois domaines sont requis pour l'activité d'intégration (Jenkins et *al*, 1997).



**Figure 3.4** Alignement des séquences des motifs DD(35)E des différentes intégrases rétrovirales et transposases bactériennes autour du résidu Glu 152 du site actif de l'intégrase de HIV-1. (Tiré de Jenkins et *al*, 1997).

La région codante de l'intégrase est bien conservée d'un rétrovirus à l'autre (figure 3.4). L'alignement des résidus près du site actif du motif DD(35)E, provenant d'intégrases rétrovirales et de certaines transposases bactériennes qui semblent utiliser un motif similaire au DD(35)E, révèle la similitude des séquences d'un virus à l'autre. Ces ressemblances de

séquence permettent d'identifier cette région comme étant très importante pour l'activité de l'enzyme (Jenkins et *al*, 1997).

## Chapitre IV

### Les traitements antiviraux

#### 4.1 Traitement anti-rétroviral actuellement disponible

L'arrivée de la thérapie anti-rétrovirale hautement active (HAART) a changé dramatiquement le pronostic des patients atteints par le HIV (Barbaro et *al*, 2005). Il existe, à ce jour, 20 molécules anti-HIV approuvées pour l'utilisation clinique (dont 15 couramment utilisées) et 30 autres, actuellement à l'étude, en phase préclinique. Les traitements présentement utilisés se divisent en 5 catégories :

La première catégorie (i) comprend les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI), qui suivent deux étapes de phosphorylation, soit la zidovudine (AZT), didanosine (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T), lamivudine (3TC) et abacavir (ABC) et l'emtricitabine. Ces analogues de nucléosides entrent en compétition avec les substrats naturels de l'enzyme. Ces composés doivent être triphosphorylés pour pouvoir agir. La première phosphorylation, prise en charge par une kinase cellulaire, est l'étape limitante de leur activité antivirale. Du point de vue virologique, ces inhibiteurs génèrent tous l'apparition de résistances. Les différents produits sélectionnent des mutations différentes, mais celles-ci induisent souvent des résistances croisées.

La seconde catégorie comprend des composés qui se fixent à l'enzyme sur un site différent de celui du substrat (ii) inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI). Dans cette catégorie, une trentaine de classes chimiques différentes ont été identifiées, dont trois produits seulement sont actuellement commercialisés (nevirapine, delavirdine et efavirenz). Les NNRTI induisent l'émergence de résistances en quelques semaines. Concernant les analogues phosphorylés (iii), les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (NTRTI), seul le tenofovir disoproxil fumarate, qui agit comme le terminateur de la chaîne au site de liaison du substrat de la RT, est commercialisé.

Tous les inhibiteurs de protéase (PI) (vi) actuellement utilisés sont des peptidomimétiques du substrat de la protéase, qui contiennent une liaison hydroxyéthylène à la place d'une liaison peptidique et qui sont, par conséquent, non clivables. Les PI qui inhibent

Les pages

24 à 28

sont manquantes



La chiméraplastie permet la correction de gène de façon permanente. De nombreuses publications mettent en évidence le potentiel d'une telle technologie et ce, indépendamment de l'ADN qui est ciblé, qu'il soit d'origine bactérienne, végétale ou mammalienne. *In vitro*, la restauration de certaine activité enzymatique a pu être obtenue. Une restauration de l'activité de la tyrosinase dans des mélanocytes de souris albinos, engendrant ainsi un changement phénotypique des cellules de souris traitées a pu être obtenue (Aleveex et Yoon, 1998). De même, la correction de la l'allèle b<sup>s</sup> de l'hémoglobine qui cause la drépanocytose à a été possible (Cole-Strauss et *al*, 1996). Des changements phénotypiques ont également été observés *in vivo* en utilisant des modèles naturels et transgéniques pour, par exemple, l'hémophilie B (où le rat et le chien ont un facteur de coagulation IX défectif). Le rat Gunn qui constitue un modèle pour le syndrome Crigler-Najjar (Kren et *al*, 1999) ainsi que des modèles (souris et chien) pour la dystrophie musculaire (Rando et *al*, 2000 et Bartlett et *al*, 2000). La chiméraplastie a également été utilisée avec succès sur des plantes (Zhu et *al*, 1999 et Cole-Strauss et *al*, 1999) et des bactéries (Liu et *al*, 2002).

Ainsi, une protéine déficiente peut être rétablie dans l'exercice de sa fonction. À l'inverse, l'expression de protéines néfastes, telles que les protéines oncogènes par exemple, pourrait être bloquée. Dans un même ordre d'idées, ceci faisant référence au présent projet de maîtrise, les protéines nécessaires à la réplication d'un virus pourraient être inactivées par l'utilisation d'oligonucléotides modifiés.

## 5.2 Type d'oligonucléotides

### 5.2.1 Les RDO ou chiméraplastes

Les oligonucléotides RNA/DNA ont d'abord été conçus par le groupe de Kmiec en basant leur théorie sur le fait qu'un oligonucléotide, composé à la fois d'ADN et d'ARN, augmenterait l'efficacité d'appariement avec l'ADN génomique cible. La structure typique du RDO consiste en un brin d'ADN et d'ARN, complémentaires l'un à l'autre, d'une longueur moyenne de 68 nucléotides et qui contient la modification de paire de base (Igoucheva et Yoon, 2000). Le RDO s'hybride parfaitement avec le gène cible, à l'exception de la base modifiée : la machinerie de réparation cellulaire corrige cette disparité en utilisant toutefois le RDO comme gabarit, engendrant donc la mutation souhaitée (Andersen et *al*, 2002). Des

résultats intéressants ont été obtenus pour la correction d'ADN épisomal dans des cellules de mammifères avec des taux de correction s'approchant de 30 % (Yoon et *al*, 1996). De plus, d'autres études ont démontré que la réparation des gènes a subsisté au-delà d'un an. Cependant, de nombreux échecs ont été notés avec leur utilisation et les taux de correction varient énormément, allant de 0,003 % à 60 % (Andersen et *al*, 2002). Plus encore, certaines tentatives pour reproduire des résultats obtenus dans la littérature, notamment ceux obtenus pour la  $\beta$ -globine et le facteur IX dans les cellules du foie, ont été vaines (Liu, et *al*, 2002).

### 5.2.2 Les ODN

Plusieurs équipes ont démontré que la chiméraplastie pouvait être réalisée plus simplement par l'utilisation d'ODN portant une simple mutation. Des résultats démontrent que les oligonucléotides simples brins sont plus actifs que les structures chimériques, RDO, qui étaient proposées à l'origine pour la réparation de gène (Liu et *al*, 2002). Des expérimentations ont permis de démontrer que les ODN contenant un nombre défini de modifications phosphorothioates et une longueur de 45 nucléotides possèdent une fréquence de correction supérieure (Gramper et *al*, 2000 a). Comme les RDO, les ODN s'hybrident avec le gène cible à l'exception de la position de la base ciblée. La fonction de restauration des gènes entre en jeu et le mécanisme de réparation des gènes endogènes répare la séquence en utilisant l'oligonucléotide comme patron, engendrant ainsi la mutagenèse (Liu et *al*, 2001).

Diverses stratégies avec des oligonucléotides ont été évaluées pour l'altération d'une séquence spécifique du génome, que ce soit dans des cellules de levure, de plantes ou de mammifères. Ces méthodes sont intéressantes car elles n'utilisent pas de vecteurs viraux. La qualité des oligonucléotides, leur pureté, de même que les paramètres de transfection jouent un rôle au niveau de la fréquence de correction des gènes. Cependant, d'autres facteurs doivent être considérés pour une fréquence de correction optimale. Les activités biologiques de la cellule, incluant la recombinaison et la réparation de l'ADN, le statut de réplication et de transcription du gène ciblé ont un impact sur le taux de correction. Mais plus encore, la cellule elle-même (car chaque type de cellule a une activité de réparation différente) peut influencer le taux de correction (Igoucheva et *al*, 2001 et Igoucheva et *al*, 2003).

Il a été démontré que les ODN affichaient une plus haute fréquence de modification (1000 fois plus) avec une orientation antisens qu'avec une orientation sens. Ceci s'explique par la spécificité du système de réparation de l'ADN pour le brin d'ODN antisens. Il a également été prouvé que l'altération du gène s'avère plus fréquente quand le gène cible est activement transcrit. Cela permet de conclure que la réparation des gènes dirigés par les ODN est probablement liée à la réparation liée à la transcription (TCR). Il est possible que la structure de la chromatine des régions hautement transcrites soit plus accessible à l'appariement, même si c'est avec un ODN, que des régions avec une transcription inactive (Igoucheva et *al*, 2003).

Là encore, les oligodéoxynucléotides démontrent une fréquence de correction des gènes supérieure aux oligoribonucléotides de séquence identique (Igoucheva et *al*, 2001). Les résultats obtenus par la même équipe démontrent que des ODN relativement courts peuvent introduire un changement dans la séquence cible des cellules de mammifères avec une fréquence similaire aux oligonucléotides chimériques ADN/ARN.

En se référant à ces résultats, Igoucheva et *al* (2001) ont utilisé des ODN pour corriger une simple mutation (un G pour un A) du gène mutant de la  $\beta$ -galactosidase, exprimé dans des extraits nucléaires ou sous forme épisomale, ainsi qu'au niveau des chromosomes de cellules de mammifères. Des taux de correction de 0,05%, 1% et 0,1% respectivement ont été obtenus. Ces résultats permettent de conclure que les ODN sont capables de fournir un taux de correction comparable à ceux des RDO (Igoucheva et *al*, 2001 et Gamper et *al*, 2000 b). D'autres expériences, menées notamment sur des chloroplastes d'épinard, corroborent ces résultats (Kmieć et *al*, 2001). Également, de plus récentes études rapportent que les ODN peuvent être utilisés efficacement pour réparer une substitution, une délétion et pour l'insertion de mutations (Liu et *al*, 2001).

En comparaison avec les RDO, les ODN, qui semblent afficher un taux de correction similaire et, parfois même, légèrement supérieur à ceux obtenus par l'utilisation d'oligonucléotides chimériques (Gamper et *al*, 2000 et Agarwal et *al*, 2003), possèdent des avantages par rapport aux chiméraplastes conventionnels. D'une part, leur structure est simple et ils peuvent être synthétisés et produits en grande quantité à titre de médicaments. Également leur coût de production est nettement inférieur et leur synthèse et purification sont plus faciles à effectuer (Liu et *al* 2002).

Des résultats très intéressants *in vivo* ont été obtenus par l'équipe de Morishita et *al*, (2002), confirmant le succès possible de la chiméraplastie *in vivo*. Dans le but de créer un nouveau modèle animal pour l'étude métabolique des lipoprotéines, l'équipe a réussi à créer une souris déficiente en apolipoprotéine E. Elle a administré à une souris des oligonucléotides antisens apoE, couplé à un complexe liposome-HVJ, par voie intraveineuse. Cela a permis de créer une souris déficiente en apoE hépatique, engendrant alors une augmentation du cholestérol et des triglycérides chez cette dernière. Les injections d'ODN ont permis de maintenir la déficience durant plus de 3 mois. Ces résultats forts encourageants démontrent l'importance de tenter les traitements *in vivo* et aussi, qu'il est possible de doser ces traitements pour obtenir une efficacité maximale et une toxicité minimale.

Des défauts dans le gène de la dystrophine causent un sévère désordre dégénératif des muscles : la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Parmi les approches de thérapie géniques, des oligonucléotides chimériques de ARN/ADN ont donné certains résultats. L'utilisation d'ODN a alors été tentée car elle offre beaucoup d'avantages par rapport aux RDO. Les efficacités ont été comparées à l'aide des souris mdx<sup>scv</sup>, modèle murin pour la DMD. Il a été trouvé que les ODN étaient capables de cibler les gènes transcrits et non-transcrits de dystrophine et qu'ils étaient capables d'induire la réparation des gènes, avec des efficacités comparables à celle obtenues avec les RDO. La réparation des gènes par les ODN a été démontrée aux niveaux du génome, de l'ARNm et des protéines dans les cellules de muscle *in vitro* et *in vivo* et la correction s'est avérée stable au fil du temps (Bertoni et *al*, 2005).

De manière intéressante, la correction a été plus efficace sur les gènes non transcrits que sur les gènes transcrits (Bertoni et *al*, 2005), contrairement à d'autres équipes qui avaient observé le contraire lors de leurs expérimentations (Igoucheva et *al*, 2001, Liu et *al*, 2001 et Igoucheva et *al*, 2003). Cela démontre que l'efficacité de réparation des gènes est liée à la séquence elle-même en plus des divers effets de la transcription (Bertoni et *al*, 2005). D'autres exemples *in vivo* ont très récemment été publiés, notamment sur des cellules épithéliales de poumons. Les expérimentations ont démontré que l'administration systémique d'une formulation d'ODN et de véhicule lipidique polyanioniques a engendré un changement positif dans l'hémodynamique systémique et pulmonaire et ce, avec une toxicité hématologique minimale (Wilson et *al*, 2005).

Des problèmes de faible stabilité, de passage transmembranaire et de ciblage dans le compartiment cellulaire approprié limitent quelque peu l'emploi des oligonucléotides en thérapie génique pour le moment (Loke et *al*, 1989 et Yakubov et *al*, 1989). Mais, en dépit de ces faiblesses, des taux de correction plus qu'intéressant ont été démontrés dans de nombreuses publications. Notamment l'équipe de Alexeev et *coll*, (2002), a réussi à corriger la mutation qui désactive le gène de la tyrosinase dans des mélanocytes de souris albinos par des ODN. Ils ont obtenu un taux de correction des gènes de 60% (en comparaison à 10 % avec les RDO). La réparation de la mutation engendre un changement dans la pigmentation des cellules.

Afin de contourner le faible taux de conversion des gènes, plus d'un ODN pourrait être utilisé à la fois. Des études ont démontré que l'utilisation de plus d'un oligonucléotide en même temps peut s'avérer efficace. En effet, lorsque deux ODN sont présents dans le noyau d'une cellule possédant un mécanisme de réparation compétent, un double ciblage, dû à l'action efficace des deux ODN, survient assez fréquemment. En utilisant deux ODN ciblant chacun un gène différent, ils ont réussi à corriger la mutation inactivante dans le gène de la tyrosinase et à introduire une mutation activante du gène c-kit dans des mélanocytes de souris albinos, engendrant alors un changement dans la pigmentation due à la correction du gène tyrosinase (Alexeev et *al*, 2002).

### 5.3 Optimisation des traitements

Un des principaux facteurs limitant le succès de la thérapie avec des oligonucléotides est leur dégradation rapide dans le sérum et dans les cellules. Cependant, ce problème peut être contourné par l'utilisation de modifications rendant les ODN plus résistants à l'action des nucléases cellulaires. La modification la plus commune est la modification ou pont phosphorothioate (Ps). Elle consiste en un remplacement d'un oxygène par un soufre entre les liens phosphates de l'oligonucléotide (Brown et *al*, 1994). Les ODN Ps qui sont hautement résistants à la dégradation par les nucléases, démontrent une plus grande fréquence de pénétration dans les cellules (Liu et *al*, 2002) et conservent plus longtemps leur habileté à former des duplexes avec leurs séquences spécifiques cibles (Vickers et *al*, 1991). Afin

d'optimiser l'efficacité des traitements, des bases modifiées phosphorothioates ont été ajoutées à nos ODN.

Toujours pour maximiser l'efficacité, un véhicule adapté facilitant l'entrée de l'ODN dans les cellules a également été employé (un liposome cationique), afin d'augmenter la stabilité et l'affinité de liaison de l'ODN (Liu et *al*, 2002). L'utilisation d'agent transporteur, afin de permettre la pénétration des oligonucléotides dans les cellules, peut s'avérer toxique pour les cellules et par le fait même, réduire le taux de conversion. Des liposomes variés existent actuellement, ces derniers incluent le *N*- [1- (2, 3- dioleoyloxy) propyl]- *N,N,N*-triméthylammonium méthylsulfate, la Lipofectamine 2000, la Lipofectine, la Superfectine et la Cytofectin (Liu et *al*, 2002). Ces agents, utilisés pour l'encapsulation et la condensation des ODN, ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Les systèmes lipidiques manquent de précision quant à l'atteinte de la cible. Des peptides tel que Poly-L-Lysine (Chen et *al*, 2000), des histones, plus spécifiquement, la Protamine, augmente l'efficacité de la transfection en condensant l'ADN et en augmentant l'intégration. Cependant, l'utilisation de courts peptides synthétiques est moins immunogène. Les polymères, tels que le polyéthylèneimine et le polyamidiamine ont été utilisés avec une certaine popularité en raison de leur grande versatilité et de leur simplicité pour la transfection. Toutefois, ces molécules se sont avérées toxiques.

Ainsi donc, plusieurs méthodes sont utilisées pour l'introduction d'oligonucléotide dans les cellules. Aucun consensus n'a toutefois été établi quant à la meilleure méthode à utiliser mais, en raison de toutes les limitations et inconvénients des diverses méthodes décrites, le transport de l'ADN est relativement restreint à l'utilisation des systèmes lipidiques (Liu et *al*, 2002). En dépit de leurs lacunes, les liposomes comportent certains avantages non négligeables tel qu'une grande efficacité de transfection, la possibilité de production à grande échelle et une faible toxicité en comparaison à d'autres agents (Chen et *al*, 2000).

De plus, l'utilisation d'un liposome permet de diminuer, de façon très importante dans certains cas, la dose d'ODN. Des ODN phosphorothioates antisens contre l'ARNm du TNF- $\alpha$  ont été administrés à des rats à raison de 10 mg/kg BW (Body Weight) durant 2 jours, engendrant une diminution du TNF- $\alpha$  dans le sérum de 62 %. Le même traitement a été utilisé mais en association à un liposome. Ils ont réussi à obtenir une inhibition de 60% du TNF- $\alpha$  avec l'application de 1,9 mg/kg BW toujours durant 2 jours. Une réduction de plus de 5 fois la

dose initialement administrée, c'est une diminution non négligeable d'un point de vue monétaire mais aussi, d'un point de vue toxicité du traitement (Ponnappa et *al*, 2005).

Des études ont également démontré une augmentation de la sécrétion de l'INF- $\gamma$  et des IgG à la suite de l'utilisation de liposome cationique (Gursel et *al*, 2001). Ici encore, cet aspect peut s'avérer intéressant dans l'optimisation des nos traitements.

## **PARTIE MÉTHODOLOGIQUE**

### **Chapitre VI**

#### **Matériels et méthodes**

##### **6.1 Design des ODN modifiés**

Nous avons conçu nos ODN mutagènes de manière à ce qu'ils introduisent une mutation non-sens au début de la séquence codante de l'intégrase (EE32 et EE34) ou une substitution d'acide aminé (EE34). Ces ODN devraient donc inhiber la synthèse de l'intégrase. Les ODN EE32 et EE33 sont conçus pour introduire un codon stop dans la séquence codante et ainsi engendrer l'arrêt de la synthèse. L'ODN EE34, quant à lui, est conçu de façon à induire une mutation qui engendrera une substitution d'un acide aminé important dans le domaine catalytique de l'intégrase. Deux oligonucléotides contrôles ont également été utilisés : un ODN antisens sauvage, identique à l'ODN mutagène mais ne présentant pas la mutation (EE32WT), et un oligonucléotide non homologue au gène de l'intégrase, homologue à une région du gène de résistance à la zéocine (EEZeoR).

##### **6.1.1 Oligonucléotides modifiés**

Les ODN (énuméré ci-dessous) sont synthétisés par la compagnie GenScript Corporation (Scotch Plains, New Jersey, États-Unis) et ont été purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). Les \* correspondent aux modifications phosphorothioates, nos ODN contiennent trois ponts phosphorothioates à chacune de leur extrémité afin d'augmenter leur stabilité.

Nos ODN mutagènes de l'intégrase ont été conçus de façon à introduire la perte d'un site de restriction. Ainsi, lorsque l'ADN des cellules traitées est digéré avec l'enzyme spécifique à chacun des ODN mutagènes, s'il y a eu une mutation, le site est perdu et



seulement l'ADN non muté est coupé. L'utilisation de l'enzyme permet donc d'augmenter la proportion d'ADN muté, car l'ADN sauvage est tout simplement coupé par l'enzyme.

ODN EE32WT :

- Oligonucléotide antisens du début de la séquence codante de l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E MuLV (position 4684-4728 de X57540).
- Fonction : « Wild Type » antisens
- Est utilisé à titre de contrôle négatif, pour s'assurer que les effets des traitements sont bien attribuables à la mutation qu'introduit l'ODN mutagène et un effet relié à la présence d'un ODN qui aurait une séquence similaire à la séquence ciblée.

5' A\*G\*G\* CTT TCC TTG ATA GAC CCA ATA TTT CTT CGC ACT GTC ATA  
A\*G\*T\* G 3'

ODN EEZeoR :

- Oligonucléotide antisens du début de la séquence de ZeoR (position 121-166 de L36849).
- Fonction : « Wild Type » antisens
- Est utilisé à titre de contrôle négatif, pour s'assurer que les effets des traitements sont bien attribuables à l'utilisation de l'ODN mutagène et non à un quelconque effet relié à la présence d'un ODN quelque soit sa séquence.

5' G\*T\* C\*CT GGA CCG CGC TGA TGA ACA GGG TCA CGT CGT CCC GGA  
C\*C\*A\* C 3'

ODN EE32 :

- Oligonucléotide antisens du début de la séquence codante de l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E MuLV (position 4684-4728 de X57540) avec une substitution non sens à la position 4708 (t en a).
- Fonction : modification d'un codon TAT en TAA avec perte du site SspI
- Est utilisé à titre d'ODN mutagène pour introduire une mutation non sens au début de la séquence codante du domaine N-terminal qui contient le motif HHCC. La substitution non sens change un t en a (TAT en TAA) et a pour effet d'introduire un codon stop.

5' A\*G\*G\* C\*TT TCC TTG ATA GAC CCA TTA TTT CTT CGC ACT GTC ATA  
A\*G\*T\* G 3'

ODN EE33 :

- Oligonucléotide antisens du début de la séquence codante de l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E MuLV (position 4876-4917 de X57540) avec une substitution non sens à la position 4894 (t en a).
- Fonction : modification d'un codon TGT en TGA avec perte du site ApaLI
- Est utilisé à titre d'ODN mutagène pour introduire une mutation non sens au début de la séquence codante du domaine N-terminal et la substitution non sens change un t en a (TGT en TGA) et a pour effet d'introduire un codon stop.

5' G\*A\* C\*T\*T\* GCT GGC ATT GAC TTG TGC TCA AGC TTT GCA GGT CTC  
A\*G\*T\* G 3'

ODN EE34 :

- Oligonucléotide antisens du début de la séquence codante de l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E MuLV (position 4953-4997 de X57540) avec une substitution à la position 4976 (g en c).
- Fonction : modification d'un codon GAT en CAT avec perte du site ClaI
- Est utilisé à titre d'ODN mutagène pour introduire un changement d'acide aminé dans le domaine central de l'intégrase qui est responsable de l'activité catalytique. La mutation d'un g en c (GAT en CAT) change une asparagine en histidine.

5'C\* A\*G\*G T\*TT TAC CTC GGT GAA ATG GAT CTC CCA GTG CGT GCC AG\* G\*  
C\*C3'

**6.2 Modèles expérimentaux****6.2.1 Introduction**

De prime abord, le protocole utilisé se réfère à celui mis au point par l'équipe de Alexeev et *coll.* (2000). Le virus Cas-Br-E se répliquant très bien dans les cellules fibroblastiques NIH 3T3, nous avons donc utilisé deux types de cellules, les NIH NE8, lignée chroniquement infectée par le clone moléculaire de Cas-Br-E et les NIH 3T3, infectées par Cas-Br-E.

### **6.2.2 Traitement de la lignée cellulaire NIH NE-8 chroniquement infectée par le rétrovirus Cas-Br-E**

Ainsi, les transfections se sont réalisées dans des cellules NIH NE-8 ensemencées, la veille, en plaque de 24 puits avec une quantité de  $10^5$  cellules par puits. Le lendemain, les transfections se sont effectuées avec le rapport ODN/Lipofectamine 2000 optimal 1 : 1, dans un volume total de 1 ml de milieu DMEM, 2% CS. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>, durant 24 heures. Le lendemain, le milieu a été changé pour du milieu DMEM, 10% CS et 1% P/S. Après 72 heures, le surnageant a été récupéré et congelé à -80°C pour être ultérieurement titré.

Les cellules ont été cultivées pour faire des culots secs afin de procéder aux diverses analyses. Les traitements aux ODN ont été faits à toutes les semaines, selon ce protocole, avec ensemencement des cellules précédemment traitées.

### **6.2.3 Traitement des cellules NIH 3T3 infectées par le rétrovirus Cas-Br-E**

Les infections se sont réalisées sur des cellules NIH 3T3 avec le virus Cas-Br-E produit par la lignée NIH NE8. Ceci a permis d'observer la cinétique d'une réelle infection et de cette façon, déterminer les temps de traitement les plus efficaces en fonction de l'évolution de l'infection et le nombre de répétitions des traitements, si cela est nécessaire, pour des effets optimaux.

#### **Infection**

Des cellules NIH 3T3 ( $5 \times 10^5$ ) ont été ensemencées la veille en pétris 60 mm dans du milieu DME, 10% Calf sérum (CS) et 1% pénicilline/streptomycine P/S 100 unités/ml. Les infections se sont effectuées avec 500  $\mu$ l de virus Cas-Br-E, titré à  $8,5 \times 10^5$  FFU/ml, additionné de 8  $\mu$ g/ml de polybrène. Ensuite, les traitements ont été appliqués à différents moments de l'infection et des doses de rappel ont également été effectuées.

## **Cinétique**

Pour chaque temps évalué au cours de l'infection, le virus contenu dans le surnageant est titré par « focci forming immunofluorescence assay » selon le protocole élaboré par Stibon et *coll* (1985) avec quelques légères modifications. Notamment en ce qui a trait au nombre de cellulesensemencées, qui est réduit afin que le temps de culture soit prolongé, pour avoir une infection maximale. Ainsi, la cinétique de l'infection s'observe par la titration du surnageant de culture cellulaire récolté et par un dosage de l'activité de la transcriptase inverse, par rAdT (protocoles décrits plus loin).

## **6.3 Analyses des effets des traitements**

### **6.3.1 Détermination du titre viral**

Les surnageants récoltés après le traitement des cellules NIH NE8 ont été utilisés pour infecter des cellules NIH 3T3, afin de titrer les virus produits par les cellules traitées. Le surnageant utilisé est celui des cellules NIH NE8 ayant été traité une fois par semaine, avec 20 ug d'ODN durant 6 semaines. L'infection a été faite sur  $1 \times 10^5$  cellules NIH 3T3,ensemencées en 60 mm la veille avec 500 ul de virus non dilué avec 8 ug/ml de polybrène.

## **Infection**

Des cellules Mus Dunni ( $2 \times 10^4$ ) ont étéensemencées la veille en pétris 60 mm dans du milieu RPMI, 5% fetal bovine serum (FBS) et 1% P/S 100 unités/ml. Le surnageant des cellules a été centrifugé et filtré en filtre 2,2 um. Plusieurs dilutions ont été faites (0,1- 0,01- 0,001- 0,0001, - 0,00001 - 0,000001) avec le surnageant dans du PBS 1X, 2% FBS contenant 32 ug/ml de polybrène. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS 1X et 500 ul et les différentes dilutions de virus ont été ajoutées. Les pétris ont été incubés une heure à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Ensuite, 3,5 ml de milieu RPMI, 5% FBS et 1% P/S ont été ajoutés. Les cellules ont ensuite été laissées en culture pour 5 jours, sans changer le milieu.

## Immunofluorescence

Les cellules ont été lavées au PBS 1X et ensuite 200 µl du premier anticorps (anticorps monoclonal dirigé contre la glycoprotéine d'enveloppe des MuLV provenant de l'hybridome 83A25 (Evans et *al*, 1990)) ont été ajoutés. Les pétris ont été incubés à 37°C pour 30 minutes. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois, très délicatement, avec du PBS 1X, 2% FCS. Après, 250 µl d'une dilution au 1 : 200 du deuxième anticorps, FITC anti IgG de souris (Cappel ICN, *Sigma*, St-Louis, MO), ont été ajoutés et les pétris ont à nouveau été incubés 30 minutes puis lavés deux fois. Les pétris ont été observés au microscope à fluorescence et les foyers fluorescents ont été comptés. Cinq champs à l'objectif 10X ont été compilés et la moyenne a été effectuée. Un graphique semi-logarithmique a été réalisé avec les dilutions en fonction du nombre de foyer. Le titre viral correspond à la dilution où un nombre total de 30 foyers par champs est observé. Cette dilution se calcule facilement à l'aide de l'équation de la droite du graphique obtenu.

### 6.3.2 Effet des traitements sur la production virale et l'activité de la transcriptase inverse rAdT

Le surnageant de culture cellulaire a été centrifugé 6 minutes à 13 000 rpm afin de culotter les débris cellulaires. Pour le test rAdT, 50 µl de surnageant de culture des cellules traitées auxquels 50 µl du pool ont été ajoutés. Le pool pour la réaction contient du Tris pH 8,3 0,1 M; DTT 0,04 M; MnCl<sub>2</sub> 12 mM; NaCl 0,12 M; oligo (dt) 2 µg/ml; polyA 20 µg/ml; dTT α<sup>32</sup> P 0,1 %; TTP 0,2 mM; NP40 0,1 % et H<sub>2</sub>O en quantité suffisante pour faire 50 µl. Les échantillons ont ensuite été incubés 90 minutes à 37°C. De ces échantillons, 10 µl ont été déposés sur une membrane DE-81 (*Wattman*, Burlington, Ontario Canada) dans un appareil de transfert « Dot-Blot ». Les puits ont été lavés 4 fois avec 100 µl de 2 x SSC (0,3 M NaCl ; 0,03 M Na-Citrate). Une autoradiographie de la membrane avec les films Hyperfilm MP (Amersham Bioscience, Little Chalfort, Buckinghamshire, Angleterre) a ensuite été réalisée. La RT a été quantifiée par analyses densitométriques.

### 6.3.3 Analyse de l'ADN proviral

La modification de l'ADN proviral des cellules traitées aux ODN modifiés a été vérifiée par PCR à partir de l'ADN de haut poids moléculaire extrait des cellules. Des amorces spécifiques permettant d'amplifier le gène de l'intégrase ont été utilisées. Les produits de PCR avec ou sans clonage, ont subséquemment été séquencés.

#### Extraction d'ADN génomique

Les culots secs provenant des cellules traitées ont été resuspendus dans 1800 µl de tampon d'extraction contenant 0.2 mg/mL de pronase, Tris 10 mM pH 7.5; EDTA 4mM pH 8; NaCl 30 mM et 0.3% de SDS, puis incubé 16 heures à 37°C. Ensuite, un volume de phénol fut ajouté et les tubes ont été incubés à 37°C sous agitation durant 5 minutes. 10 volumes d'éthanol ont été ajoutés et une fois précipitée, la pelote d'ADN fut récoltée. L'ADN a été resuspendu dans 200 µl d'H<sub>2</sub>O et agité 16 heures à 4 °C.

#### Digestion avec les enzymes présentant un site spécifique dans chacun des ODN modifiés

Après avoir dosé les ADN des cellules traitées, les enzymes spécifiques à chacun des ODN modifiés ont été utilisés : Ssp I (New England Biolabs, Pickering, Ontario, Canada) pour l'ODN EE32, ApaL I (New England Biolabs) pour l'ODN EE33 et Cla I (GE Amersham Bioscience, Little Chalfort, Buckinghamshire, Angleterre) pour l'ODN EE34. Les réactions se sont effectuées O/N à 37 °C dans un volume final de 50 µl, avec 50 unités d'enzyme pour 10 u/µg d'ADN, dans le tampon recommandé par le fournisseur.

#### PCR

La Taq Platinum (*Invitrogen*, Mississauga, Ontario, Canada) a été utilisée. La PCR s'est effectuée avec 10 µl des ADN extraits auxquels ont été ajoutés 5µl de tampon 10X, 1µl de dNTP 10mM, 1 µl de chacune des amorces Cas-IN-1 (5'- A C A C T T A T G A T A G A A A A C T C A A C C C C - 3') 10 uM et Cas-IN-2 (5'- C T G C G G C A T G C C G A A C C T A G -3') 10 uM, 0,25µl de Taq Platinum DNA polymérase 5ug/ul, 2ul de MgSO<sub>4</sub> 50 mM

et 29,8 µl H<sub>2</sub>O pour chacun des échantillons. Les échantillons ont été chauffés à 94 °C durant 2 minutes pour ensuite subir 30 cycles à 94 °C, 30 secondes, 55 °C, 30 secondes et 68°C, 1 minute. Les réactions seront ensuite incubées à 68 °C, durant 10 minutes suivies d'un retour à 4 °C.

### **Séquençage direct des produits de PCR**

Les produits de PCR ont ensuite été envoyés au séquençage pour une confirmation à la plateforme de Génome Québec de l'Université Mc Gill.

### **Élution des produits de PCR**

Les éluions ont été effectuées avec le kit QiaexII de la compagnie *Qiagen* (Mississauga, Ontario, Canada), selon les instructions du fabricant.

### **Clonage**

Le vecteur pDrive du « PCR Cloning Kit » (*Qiagen*) a été utilisé pour les clonages. La première étape, la ligation, s'est effectuée selon les recommandations du fabricant. Pour la transformation, 5µl du produit de ligation ont été ajoutés à 100µl de bactéries compétentes DH5α, puis incubés 45 secondes à 42 °C, pour faire un choc thermique. 200µl de milieu LB ont ensuite été ajoutés et les échantillons ont été incubés à 37 °C sous agitation. Finalement, les échantillons ont été mis sur pétris d'agar contenant de l'ampicilline 100X et du X-Gal et incubés 16 heures à 37 °C.

### **Mini prep**

Les mini prep d'ADN plasmidique (« Miniprep ») ont été effectués avec le « Qiaprep Spin Miniprep Kit » de la compagnie *Qiagen* selon les instructions du fabricant.

#### 6.3.4 Analyse de l'ARN viral

L'effet des traitements sur l'ARN viral a également été étudié, par RT-PCR, puis par séquençage des produits de PCR.

##### RT-PCR

L'extraction de l'ARN des cellules traitées s'est effectuée avec du Trizol (*Invitrogen*) selon les recommandations du fournisseur. Avant d'effectuer la RT, les ARN ont été traités à la DNase, afin de les débarrasser d'une potentielle contamination à l'ADN. Le traitement à la DNase s'est fait sur 20ug d'ARN avec le DNA free kit (*Ambion*, Austin, Texas, États-Unis) selon le protocole du fournisseur. L'ARN a été repris dans 20ul d'H<sub>2</sub>O. La RT s'est effectuée avec 10 ul des ARN traités à la DNase (équivalent à environ 10 ug) auxquels ont été additionnés 2ul de Tampon 10X, 1ul de dNTP 10 uM, 0,3ul d'Oligo dt 20 ug/ul, 0,5 ul inhibiteur de RNase, 0,2 ul de RT MuLV et 6ul H<sub>2</sub>O pour chacun des échantillons. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 37 °C durant 60 minutes. La PCR avec les produits de la RT a été exécutée tel que décrite précédemment.

#### 6.3.5 Analyse des protéines virales

L'effet des traitements sur la synthèse de l'intégrase a été vérifié par Western blot avec un anticorps ciblant l'IN et la RT, afin de faire l'analyse des différentes protéines produites.

##### Électrophorèse sur gel d'acrylamide

À la suite de l'extraction des protéines selon le protocole décrit par Mulder et *coll.* (2002), un gel SDS PAGE 12 % a été fait avec 100 ug de protéine totale. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (*Millipore*, Paris, France). Le transfert a été effectué pendant deux heures à 300 mA.



### **Immunodétection**

La membrane a ensuite été lavée deux fois, 5 minutes, sous agitation, à température ambiante avec du PBS-Tween 0,1% puis saturée une heure dans du lait 5% PBS-Tween 0,1% à température ambiante. Ensuite elle a été placée en présence du premier anticorps, DC-1 anti-pRT24, un anticorps actif contre l'IN et la RT (Hu et *al*, 1986) (dilué 1 : 1000) et incubée une nuit sous agitation à 4 °C. Après deux lavages de 5 minutes dans du tampon PBS-Tween 0,1%, la membrane a été incubée avec le deuxième anticorps, anti-IgG de souris HRP (*Amersham*) dilué (1 : 1000) dans le tampon de saturation pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Ensuite, deux lavages de 5 minutes au PBS-Tween 0,1% ont été effectués, puis une révélation avec le Kit de détection ECL+ (*Amersham Bioscience*, Little Chalfort, Buckinghamshire, Angleterre) avec un film Hyperfilm ECL (*Amersham Bioscience*) a été effectuée.

## **PARTIE RÉSULTATS**

### **Chapitre VII**

#### **Effets des traitements sur les cellules NIH NE8**

##### **7.1 Mise au point des conditions de transfection**

Avant de procéder aux traitements, des tests d'optimisation ont été effectués avec différents types de liposomes tel que la Transfectine (*Invitrogen*), la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) et le Polyfect (*Qiagen*). Différents ratios ODN : liposome ont également été testés. La Lipofectamine 2000, un liposome cationique, s'est avérée être la plus efficace et la moins toxique pour les cellules fibroblastique de souris NIH 3T3. Afin de déterminer l'effet de l'ODN, le surnageant a été récolté trois jours après chaque transfection et les virus titrés par focci forming unit assay et par dosage rAdT.

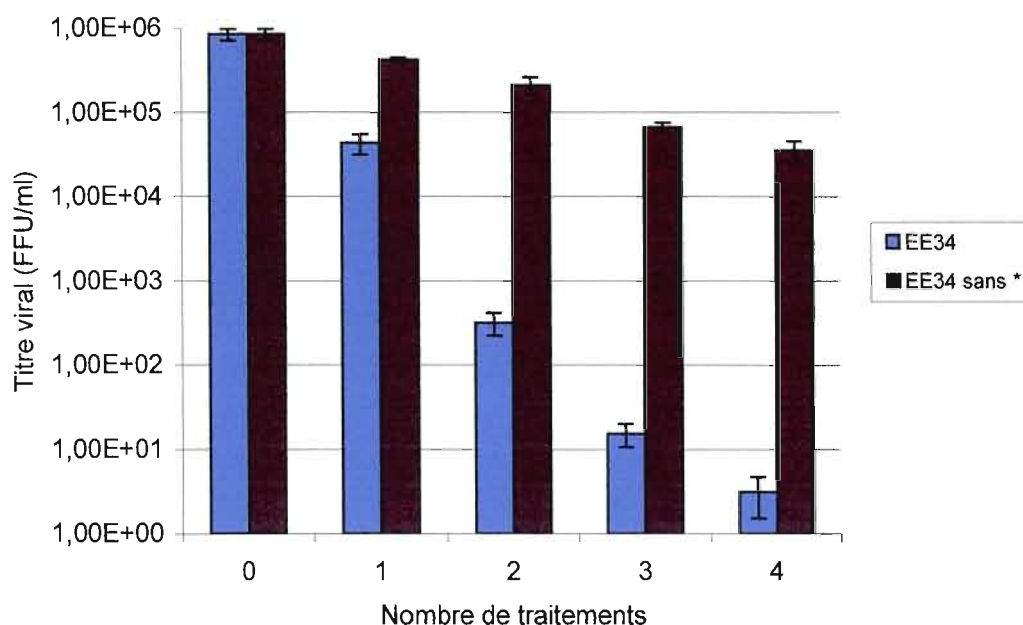
**Tableau I.** Inhibition de la production virale en fonction de la quantité d'ODN EE34 et de liposome (Lipofectamine 2000) utilisée sur des cellules NIH NE8

Quantité d'ODN (ug)	Ratio ODN : liposome (ug:ul)	Titre viral (FFU/ml)	% Production virale	Écart-type %	% Inhibition virale
0	-	$8,5 \times 10^5$	100	2,9886	0
20	1 : 1	$4,5 \times 10^4$	5,2361	3,5263	94,7638
30	1 : 1	$4,6 \times 10^3$	0,5373	0,2603	99,4627
40	1 : 1	$1,4 \times 10^2$	0,0164	0,0098	99,9835
50	1 : 1	$3,2 \times 10^1$	0,0037	0,0027	99,9962
60	1 : 1	0	0	0	100
20	1 : 2	$4,0 \times 10^4$	4,7368	1,2202	95,2638
30	1 : 2	$3,4 \times 10^3$	0,4032	0,1039	99,5968
40	2 : 1	$8,1 \times 10^4$	9,5196	0,6195	90,4804
60	2 : 1	$5,4 \times 10^3$	0,6342	0,1231	99,3657

Le tableau I montre que les différences d'inhibition de la production virale, en ce qui a trait à l'utilisation d'un rapport ODN : Liposome 1 : 1 ou 1 : 2, ne sont pas importantes. Ainsi, 30 ug (2,01 uM) d'ODN avec 30 ul de lipofectamine 2000 donne 99,4626 % d'inhibition, alors que 30 ug d'ODN avec 60 ul donne 99,5968 %; il n'y a donc pas une différence marquée. Cependant, l'inhibition de la production virale s'avère nettement moins efficace lorsque qu'un rapport ODN : Liposome 2 : 1 est utilisé. Une quantité de 60 ug (4,02 uM) d'ODN avec 30 ul de Lipofectamine 2000 donne une inhibition de 99,3657 %. Une quantité de 30 ug 1 : 1 est l'équivalent de 60 ug 2 : 1, seulement 30 ug d'ODN peuvent pénétrer dans les cellules avec 30 ul de Lipofectamine 2000. Ceci amène à conclure que la quantité d'ODN efficace est directement limitée par la quantité de liposome. Cela est très marqué si on se réfère aux données recueillies pour un rapport ODN : liposome de 20 : 40 avec 95,2631 % d'inhibition par opposition à 90,4804 % d'inhibition avec 40 : 20.

Contrairement aux recommandations du fabricant, ces tests n'ont pas démontré qu'il était vraiment plus efficace d'utiliser une plus grande quantité de liposome que d'ADN pour

les transfections. Un rapport 1 : 1 s'avère tout à fait adéquat et, de plus, la Lipofectamine 2000 est l'élément limitant en terme de toxicité pour les transfections. Une quantité supérieure à 60  $\mu$ l de Lipofectamine 2000 s'avère nocive pour les cellules et donc, en fonction de ces résultats, un rapport ODN : Lipofectamine 2000 1 : 1 a été adopté.



(\* : modification phosphorothioate)

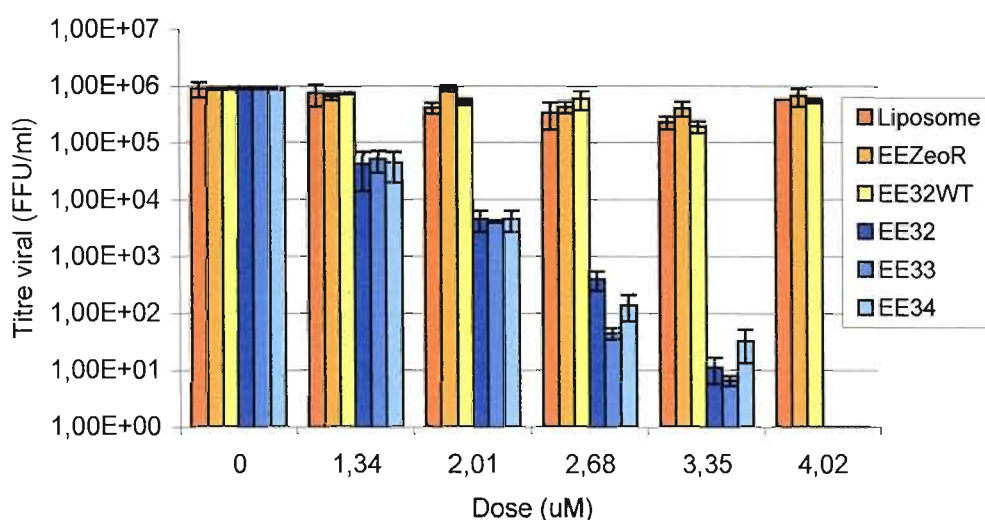
**Figure 7.1** Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements (1,34  $\mu$ M ODN) avec les ODN EE34 avec et sans modifications phosphorothioates.

Afin d'optimiser les traitements, des modifications phosphorothioates ont été ajoutées aux ODN. L'importance de cette modification est très bien documentée (Vickers et *al*, 1991 et Liu et *al*, 2002). Il est cependant assez stupéfiant de voir la différence d'efficacité d'un même ODN mutagène avec et sans modifications phosphorothioates. En se référant à la figure 7.1, l'ajout de modifications phosphorothioates est primordial pour l'efficacité du traitement. Alors que 4 traitements (un à chaque semaine) de faible dose (1,34  $\mu$ M) de l'ODN EE34 sont suffisants pour pratiquement inhiber la production virale, 4 traitements avec l'ODN EE34 sans \* ont un effet très limité sur la production, à peine la perte d'un peu plus d'un log de titre. En

comparaison, 4 traitements avec un ODN sans pont phosphorothioate équivalent à un seul traitement avec l'ODN EE34.

## 7.2 Traitement des cellules NIH NE8

### 7.2.1 Titre viral déterminé par titration des virus produits par immunofluorescence



**Figure 7.2** Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction de la quantité d'ODN utilisée.

La figure 7.2, représente les titres des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction de la quantité d'ODN utilisée. Il est intéressant de noter que l'effet est dépendant de la dose du traitement. Un traitement de forte dose avec les ODN mutagènes (4,02 uM) est suffisant pour inhiber complètement la production de virus infectieux. L'effet inhibiteur dépend de la présence de mutation dans la séquence car les contrôles (ODN EE32WT, EEZeoR et le liposome) n'ont pas d'effet sur la production virale. Les contrôles se comportent de façon similaire au contrôle positif, c'est à dire les cellules qui n'ont subi aucun traitement (0).

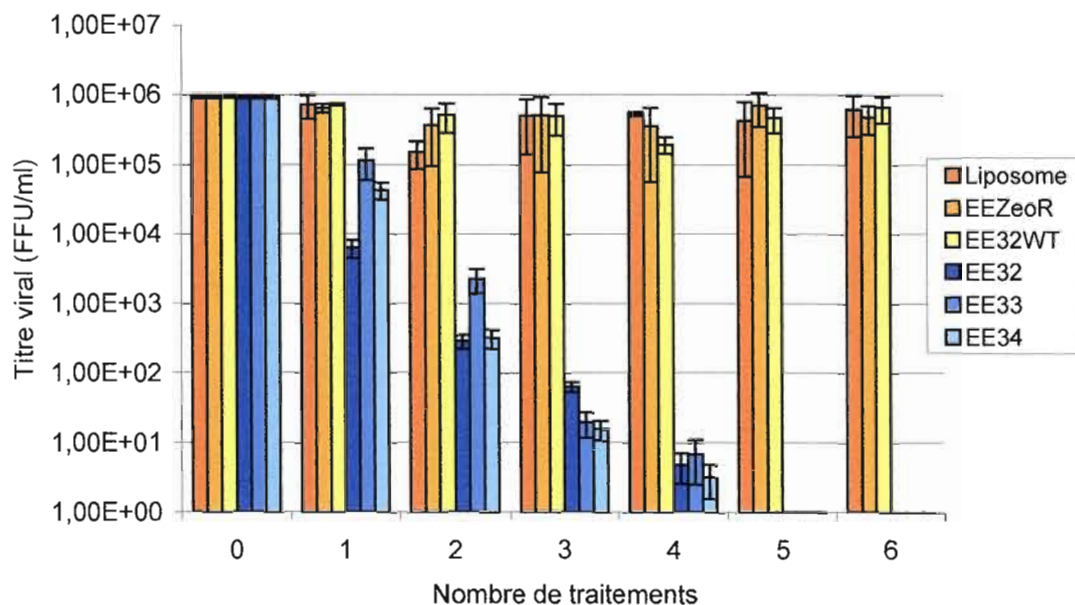
Résultats un peu surprenants, les ODN contrôles n'affichent pas de différence notable entre eux. Avec le EE32WT, il aurait été possible de voir une légère inhibition, due à un effet

Résultats un peu surprenants, les ODN contrôles n'affichent pas de différence notable entre eux. Avec le EE32WT, il aurait été possible de voir une légère inhibition, due à un effet antisens mais, en fait, il se comporte de façon similaire au EEZeoR. Il y a cependant une très légère baisse de titre au niveau des contrôles lorsque les doses dépassent les 2,5 uM : cela est peut-être dû à une certaine toxicité du traitement, provenant du liposome ou des ODN eux-mêmes.

Les  $IC_{50}$  (tableau II) pour les ODN mutagènes EE32, EE33 et EE34 sont 0,447 uM, 0,424 uM, et 0,426 uM, respectivement. Quantité tout à fait comparable, indépendamment de l'effet théorique engendré par l'ODN mutagène, que ce soit le changement de nucléotide T en A engendrant l'apparition d'un codon stop (EE32 et EE33) ou un changement d'acide aminé du domaine catalytique de l'intégrase avec un changement d'un G en C (EE34).

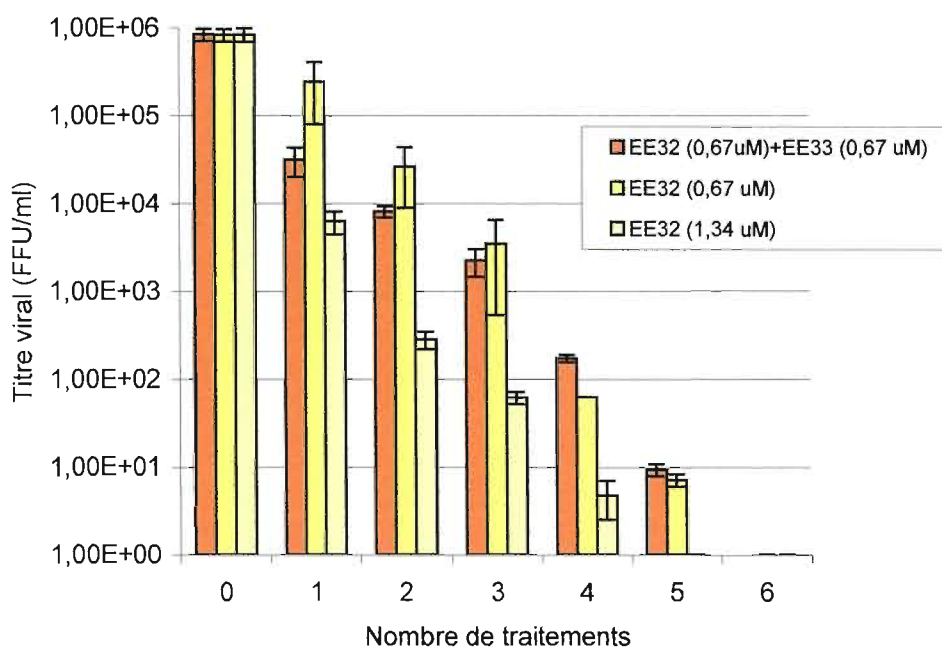
**Tableau II.** Effet inhibiteur des ODN mutagènes déterminé par les  $IC_{50}$  de chacun d'eux en fonction des régions ciblées et de leur mode d'action.

ODN mutagène	Région ciblée	Mode d'action	$IC_{50}$ (uM)	Écart type (uM)
EE32	N-terminale de IN du Cas-Br-E	Induire un codon stop	0,447	0,064
EE33	N-terminale de IN du Cas-Br-E (HHCC)	Induire un codon stop	0,424	0,048
EE34	Domaine central de IN du Cas-Br-E (DDE)	Substitution d'acide-aminé	0,426	0,041



**Figure 7.3** Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements de faible dose (1,34  $\mu$ M d'ODN) appliqué une fois par semaine.

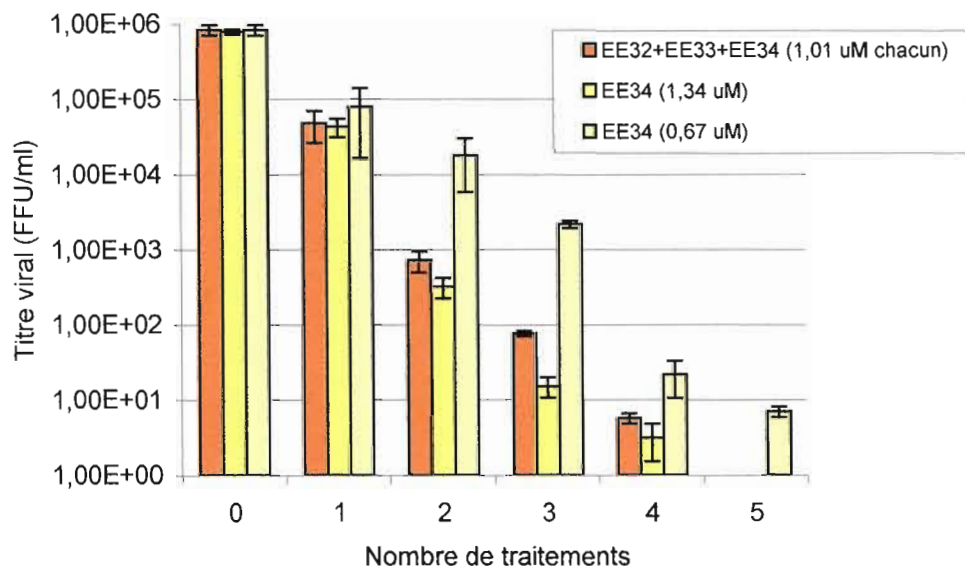
À la figure 7.3, il est question du titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements de faibles doses appliqués une fois par semaine. Il est notable que l'effet est dépendant du nombre de traitements. Un traitement de 1,34  $\mu$ M d'ODN mutagène, répété 5 fois, à raison d'un traitement par semaine, est suffisant pour inhiber complètement la production virale. Comme précédemment, les contrôles (ODN EE32WT, EEZeoR et liposome) n'ont pas eu d'effet sur la production virale, se comportant de façon similaire aux cellules NIH NE8 non traitées. Tout comme à la figure 7.2, l'ODN EE32WT n'a pas eu d'effet sur la production virale, réfutant donc la possibilité que l'effet des ODN mutagènes EE32, EE33 et EE34 soit le résultat d'un mécanisme antisens. D'autant plus que ces cellules ont été cultivées durant plus de 70 jours, maintenant toujours leur titre viral à zéro, même après cette période de temps. Le contrôle ODN EEZeoR montre que l'ODN lui-même n'est pas toxique en soit et que l'utilisation d'un ODN, quel que soit sa séquence, n'a pas d'impact sur la production virale. Le liposome utilisé seul semble indiquer peu ou pas de toxicité.



**Figure 7.4** Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements avec et sans mixte d'ODN mutagène avec un ratio ODN : liposome de 1 : 1.

À la figure 7.4, il est question de mixte de traitement. Le but était d'accumuler plusieurs mutation dans la séquence de l'IN. En se référant aux résultats obtenus, il est clair que l'utilisation de plus d'un ODN mutagène n'a pas d'effet additif. Le mixte des ODN EE32 et EE33 avec 0,67 uM de chacun agit comme un traitement de 0,67 uM avec un seul ODN mutagène plutôt que comme un seul traitement de 1,34 uM, soit le double de la dose. Une inhibition complète de la production virale est obtenue avec 6 traitements, résultat comparable à l'utilisation d'un seul ODN à très faible dose (0,67 uM).

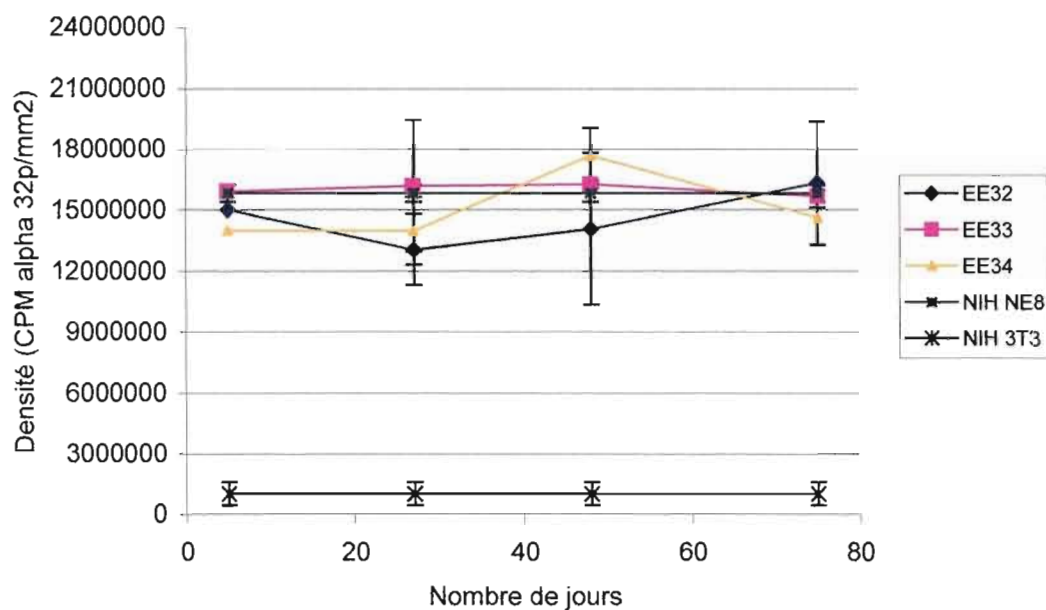




**Figure 7.5** Titre des virus produits par les cellules NIH NE8 en fonction du nombre de traitements avec un mixte d'ODN mutagènes avec un ratio ODN : liposome de 1,5 : 1 pour le mixte des 3 ODN avec 1,01 uM chacun, un ratio 1 : 1 pour les traitements avec 1,34 uM et 0,67 uM.

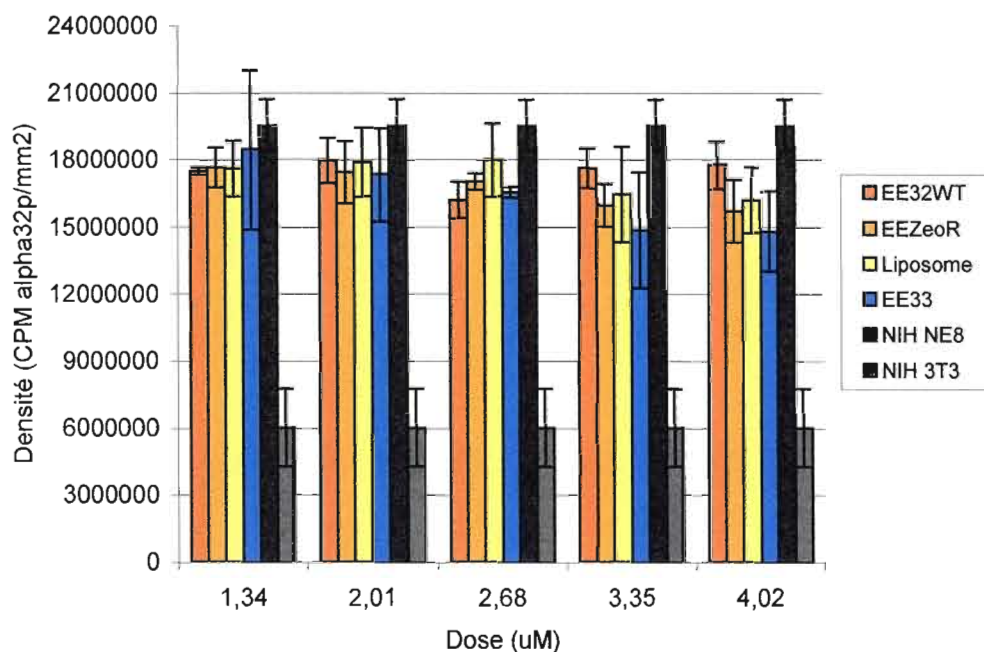
De la même façon qu'avec les mixtes de deux ODN mutagènes (figure 7.4), l'utilisation de trois ODN mutagènes (figure 7.5) n'a pas d'effet additif. Le mixte des ODN mutagènes EE32, EE33 et EE34 avec 1,01 uM de chacun, agit avec une efficacité comparable à l'utilisation d'un seul ODN avec 1,34 uM avec une perte d'environ 1 à 1,5 de log plutôt que de 3,5 à 4,5 de log comme c'est le cas avec un seul traitement de 3,35 uM (se référer à la figure 7.2). Cependant, il est possible que cette perte d'efficacité soit dû au ratio ODN : Liposome, tel que décrit dans le tableau I. Une inhibition complète de la production virale est obtenue avec 5 traitements.

### 7.2.2 Analyse de l'activité de la transcriptase inverse déterminé par tests rAdT



**Figure 7.6** Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par test rAdT. Cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes et cultivées après le 6<sup>e</sup> traitement hebdomadaire de 1,34  $\mu$ M. Le contrôle positif est le surnageant des cellules NIH NE8 sans traitement.

Le test rAdT permet de dire s'il y a présence de particules virales dans le surnageant de culture des cellules traitées. La figure 7.6 montre très clairement que la transcriptase inverse est toujours active et ce, en dépit du fait que les cellules NIH NE8, après leurs 6 traitements, ont un titre de zéro, d'ailleurs maintenu après 75 jours de culture. Il y a donc toujours production de virus et l'activité de la RT n'est pas affectée par les ODN mutagènes. Mais compte tenu des résultats précédents (figure 7.2), ces virus sont non infectieux.



**Figure 7.7** Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par test rAdT. Cellules NIH NE8 traitées selon différentes doses d'ODN. Le contrôle positif est le surnageant des cellules NIH NE8 sans traitement.

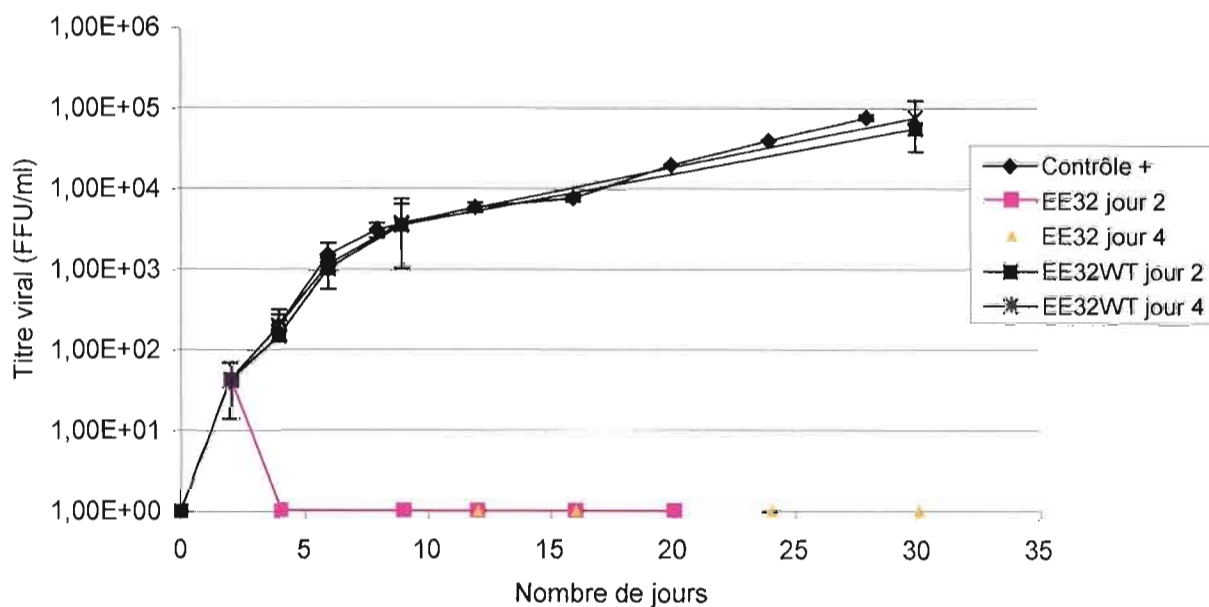
Ici également, à la figure 7.7, en dépit du fait que de fortes doses d'ODN soient utilisées, l'activité de la RT est peu affectée par les traitements, car à 3,35 uM et 4,02 uM, une légère inhibition est observable. Que ce soit avec l'ODN mutagène EE33 ou avec les contrôles, aucune différence n'est observée. Ces résultats démontrent qu'il y a cependant toujours production de virus mais qu'ils sont non infectieux (se référer à la figure 7.2).

## Chapitre VIII

### Effets des traitements sur les cellules NIH 3T3 infectées par le rétrovirus Cas-Br-E MuLV et traitées à différents temps post-infection

#### 8.1 Traitement des cellules NIH 3T3 infectées

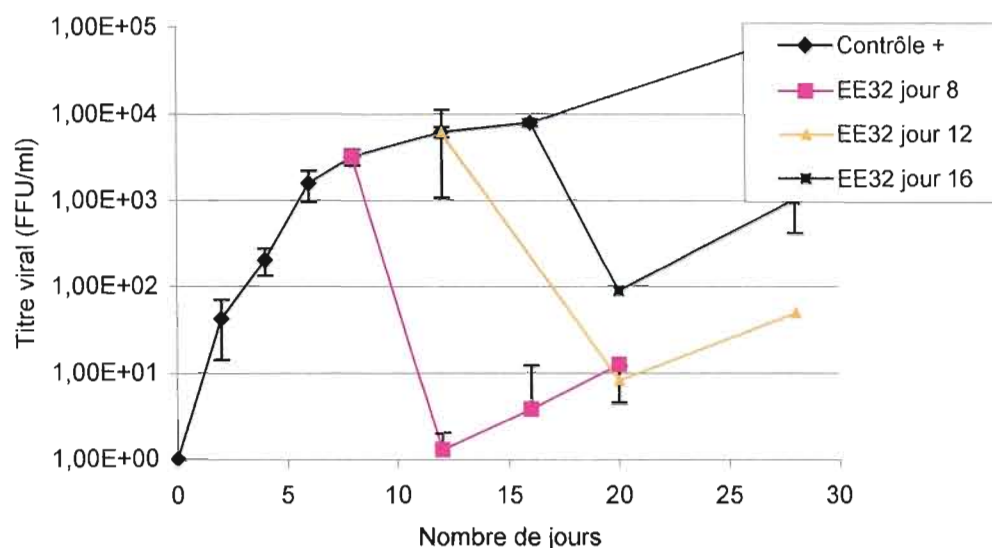
##### 8.1.1 Titre viral déterminé par titration des virus produits par immunofluorescence



**Figure 8.1** Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées à différent temps post-infection avec 1,34  $\mu$ M des différents ODN.

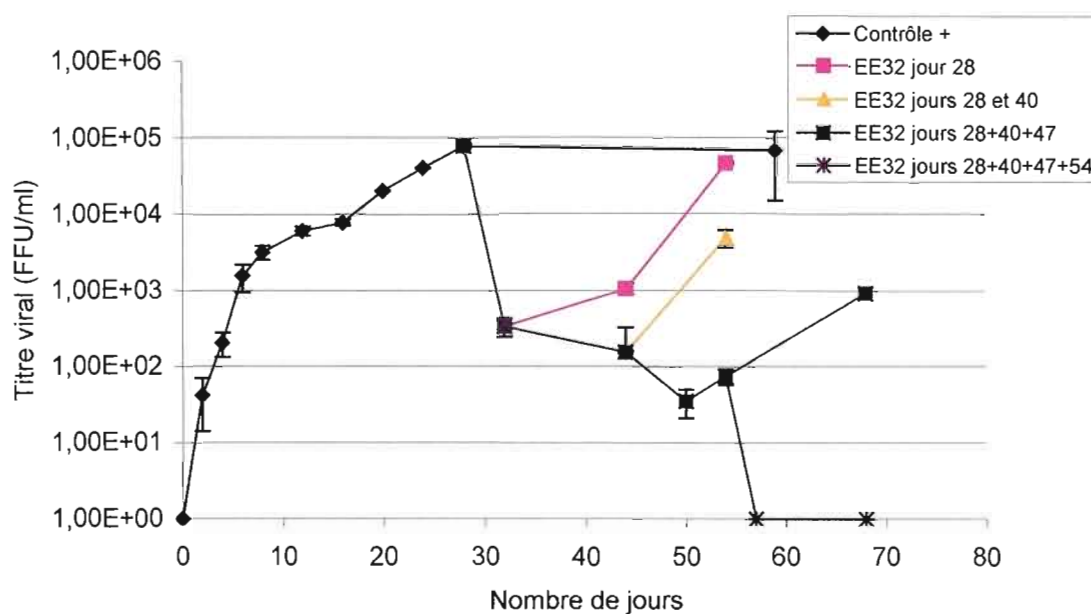
En se référant à la figure 8.1, il est notable qu'une inhibition complète de la production virale est possible avec un traitement de faible dose (1,34  $\mu$ M) ciblé dans les quatre premiers jours de l'infection. Même lorsque les cellules traitées ont été cultivées plusieurs jours après l'administration du traitement avec les ODN mutagènes, aucune production de virus infectieux n'a été observée. Les traitements avec l'ODN contrôle EE32WT n'ont aucun

effet sur la cinétique de l'infection et les cellules traitées se comportent exactement comme le contrôle positif, qui n'ont pas été traitées.



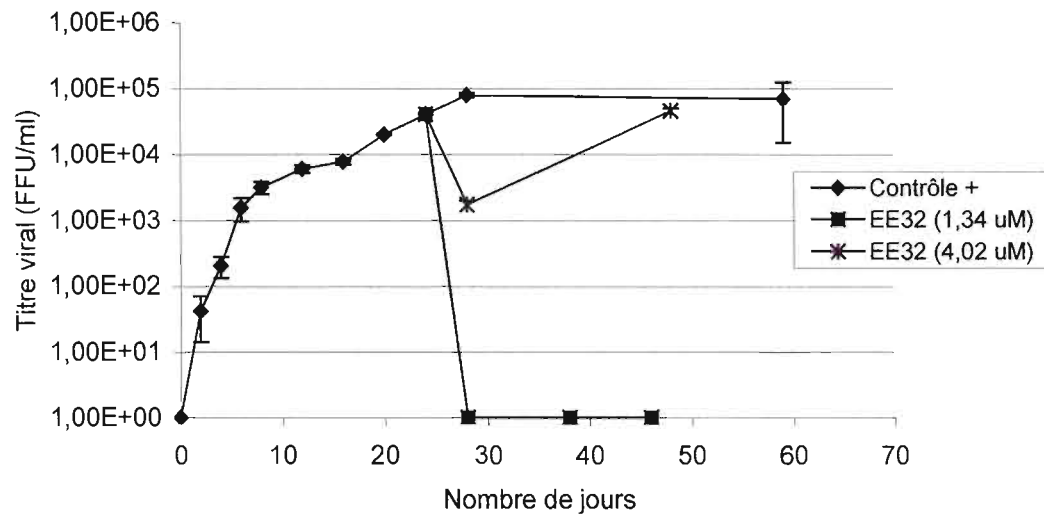
**Figure 8.2** Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées à différent temps post-infection (1,34 uM d'ODN).

Après 4 jours suivant l'infection, la faible dose de 1,34uM (figure 8.2) est insuffisante pour inhiber l'infection. Plus l'infection avance, plus le titre de particules virales infectieuses est élevé et, par conséquent, moins le traitement avec les ODN mutagènes est efficace.



**Figure 8.3** Titre des virus produits après répétition des traitements par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E à différent temps post-infection. Traitements avec 1,34  $\mu$ M d'ODN mutagène.

La figure 8.3 montre que l'application de plusieurs traitements de faibles doses, lorsque l'infection est devenue chronique, est efficace pour inhiber complètement la production de virus infectieux. Une répétition de 4 traitements effectué au jours 28, 40, 47 et 54 avec 1,34  $\mu$ M, est nécessaire pour enrayer complètement la production de virus infectieux et pour que cette inhibition se maintienne dans le temps.



**Figure 8.4** Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées au jour 24 post-infection avec différentes doses d'ODN mutagène (1,34 uM et 4,02 uM).

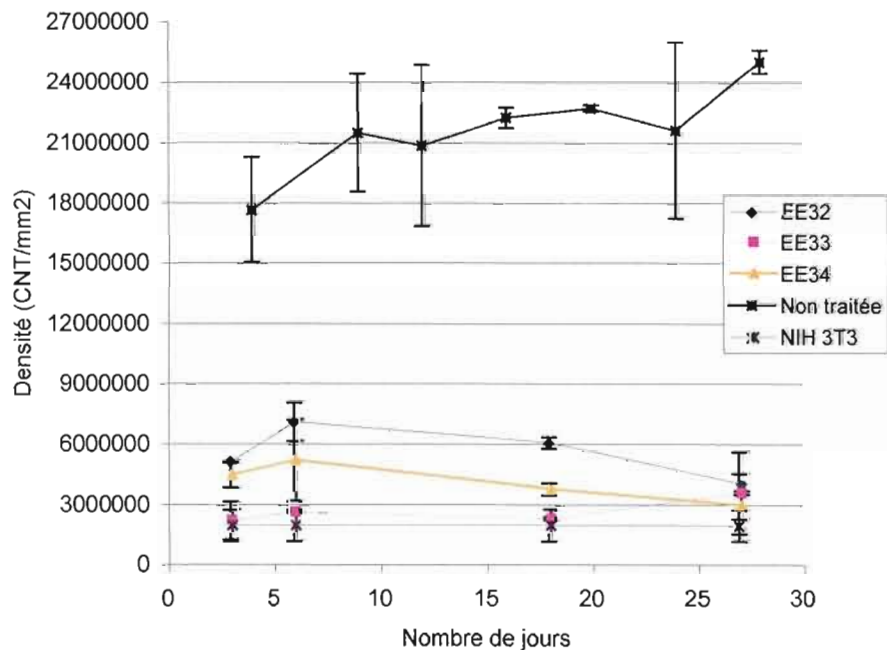
Comme avec la figure NIH NE8, la figure 8.4 démontre qu'un seul traitement à forte dose (4,02 uM) est suffisant pour inhiber la production de virus infectieux, en comparaison à un traitement de faible dose de 1,34 uM, où l'infection redémarre. Ainsi au vingt-quatrième jour d'infection, alors que l'infection est chronique, une seule dose massive est efficace pour enrayer la production de virus infectieux.

## Chapitre IX

### Pouvoir infectieux des virus produits par les cellules traitées

#### 9.1 Analyse des virus produits par les cellules NIH NE8 traitées

Les résultats obtenus précédemment; un titre viral à zéro mais une activité de la transcriptase inverse toujours présente, amène à conclure que les cellules traitées produisent toujours des particules virales, mais que les virus sont non infectieux. Afin de confirmer cette hypothèse, des cellules NIH 3T3 ont été infectées avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes, une fois par semaine, durant 6 semaines avec 1,34  $\mu\text{M}$  et cultivées après le dernier traitement pendant 75 jours. Tel que démontré à la figure 7.6, ces virus possèdent toujours une activité de la RT en dépit du fait que le titre viral soit à zéro.

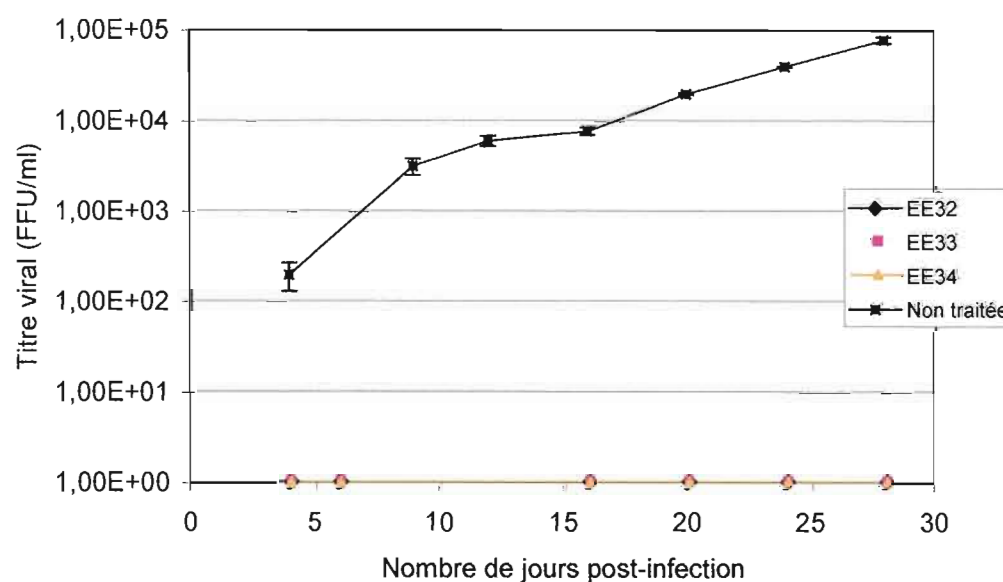


**Figure 9.1** Dosage de l'activité de la transcriptase inverse par rAdT. Infection de cellules NIH 3T3 avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes, une fois par semaine, durant 6 semaines avec 1,34  $\mu\text{M}$  et cultivées après le dernier traitement pendant 75 jours.



La figure 9.1 représente l'activité de la RT des cellules NIH 3T3 qui ont été infectées par le surnageant de culture cellulaire des cellules NIH NE8 traitées aux ODN avec une dose de 1,34  $\mu\text{M}$ , à raison d'une fois par semaine durant 6 semaines, et cultivé après le dernier traitement, durant 75 jours. La culture des cellules a été faite afin de s'assurer que l'effet obtenu se maintienne bien dans le temps et qu'il n'y a pas, au bout d'un certain moment, reprise d'une production de particules virales infectieuses.

Les cellules NIH 3T3 infectées avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées aux ODN mutagènes ont une activité de RT nettement inférieure à celle infectées avec le surnageant de cellules NIH NE8 non traitées. Aucune infection n'est observée, si bien que les cellules NIH 3T3 infectées se comportent de façon similaire au contrôle négatif (NIH 3T3), par opposition aux cellules qui sont infectées par le surnageant des cellules NIH NE8 non traitées.



**Figure 9.2** Titre des virus produits par les cellules NIH 3T3 ayant été infectées avec le surnageant des cellules NIH NE8 traitées avec les ODN mutagènes, une fois par semaine, durant 6 semaines avec 1,34  $\mu\text{M}$  et cultivées après le dernier traitement pendant 75 jours.

À la figure 9.2, les titrations par immunofluorescence corroborent les résultats trouvés en test rAdT. Aucune infection n'a été décelée et des titres de zéro ont été obtenus pour les cellules NIH 3T3 infectées avec le surnageant des NIH NE8 traitées aux ODN mutagènes, contrairement à un titre viral de  $7,79 \times 10^4$  FFU/ml (après 28 jours d'infection) pour les cellules NIH 3T3 infectées par le surnageant des cellules NIH NE8 non traitées.

Ces résultats permettent de conclure que les virus produits par les cellules traitées aux ODN mutagènes (et dont le titre est de zéro, 75 jours après le dernier traitement) sont non infectieux. Il est clair que ces virus ne sont pas capables d'infecter d'autres cellules.

## **Chapitre X**

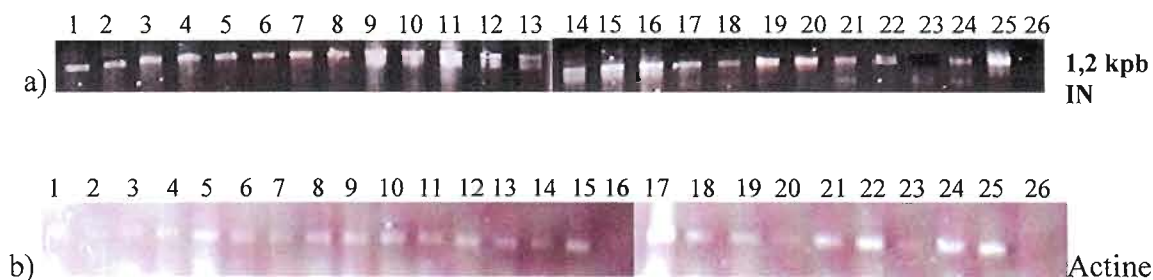
### **Effets des traitements sur l'expression de l'intégrase**

#### **10.1 Introduction**

Les ODN mutagènes n'ont pas d'effet sur la RT, les tests de dosage de l'activité de la RT n'ont pas démontré une altération de l'activité enzymatique, peu importe le traitement (ODN mutagènes ou contrôles), la quantité et le nombre de répétitions utilisées. Les traitements aux ODN mutagènes (EE32 et EE33) devraient théoriquement arrêter la synthèse de l'IN. Afin de déterminer l'effet des ODN sur l'intégrase, des analyses des protéines totales par Western blot, de même que l'analyse des ARN des cellules traitées, ont été effectuées.

#### **10.2 Analyse de l'ARN des cellules traitées aux ODN**

La RT-PCR réalisée en utilisant des amorces spécifiques le l'IN, démontre que l'ARN virale pleine longueur est normalement synthétisé et qu'il n'y a pas de variation quantitatives de l'expression virale en se référant au contrôle de l'actine (figure 10.1 b). Il y a donc présence de l'intégrase, en dépit du fait que les surnageants de ces cellules traitées ont un titre viral de zéro. L'intégrase est toujours présente, peu importe le traitement qui a été appliqué.



**Figure 10.1** Analyse de l'ARN des cellules traitées aux ODN par RT-PCR. a) Amorces IN b) Amorces Actine

#### Légende

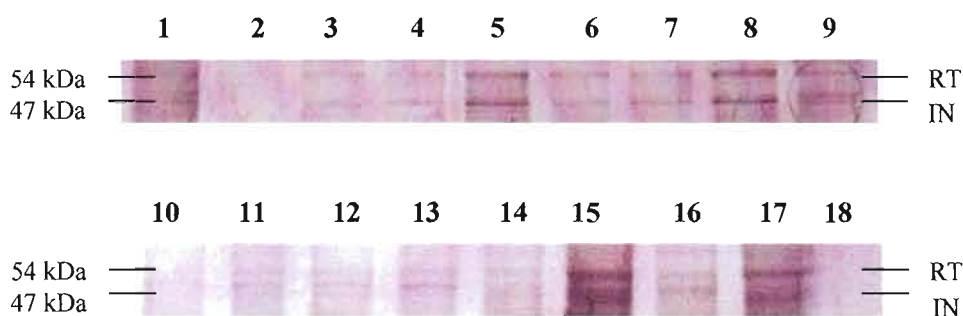
1= NIH NE8 dose dépendante ODNEE32, 1,34 uM, jour 20	15= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32, 8 jours après l'infection, jour 23
2= NIH NE8 dose dépendante ODNEE32, 2,01 uM, jour 20	16= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32, 1 heure après l'infection, jour 18
3= NIH NE8 dose dépendante ODNEE32, 2,68 uM, jour 20	17= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEEWT32, 1 heure après l'infection, jour 18
4= NIH NE8 dose dépendante ODNEE32, 3,35 uM, jour 20	18= NIH infectées par Cas-Br-E jour 18 de l'infection
5= NIH NE8 dose dépendante ODNEE32, 4,02 uM, jour 20	19= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32, 16 jours après l'infection, jour 23
6= NIH NE8 dose dépendante ODNEE34, 1,34 uM, jour 20	20= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32WT, 16 jours après l'infection, jour 23
7= NIH NE8 dose dépendante ODNEE34, 2,01 uM, jour 20	21= NIH infectées par Cas-Br-E jour 55 de l'infection B
8= NIH NE8 dose dépendante ODNEE34, 2,68 uM, jour 20	22= NIH infectées par Cas-Br-E jour 55 de l'infection C
9= NIH NE8 dose dépendante ODNEE34, 3,35 uM, jour 20	23= NIH
10= NIH NE8 dose dépendante ODNEE34, 4,02 uM, jour 20	24= NIH NE8
11= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE32, 1,34 uM, jour 85	25= Contrôle + du PCR
12= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE33, 1,34 uM, jour 85	26= Contrôle - du PCR
13= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE34, 1,34 uM, jour 85	
14= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32WT, 8 jours après l'infection, jour 23	

À la figure 10.1 a) une bande de 1,2 kpb est visible dans tous les puits sauf aux puits 23 et 26, NIH et contrôle négatif du PCR respectivement, ce qui est normal. Cependant, la présence de bandes pour les cellules traitées aux ODN mutagènes signifie que l'ARN viral pleine longueur est toujours synthétisé malgré le traitement. Les ODN mutagènes n'affectent pas la transcription virale. Avant de procéder à la RT, les ARN ont été traités à la Dnase; une PCR a d'ailleurs été faite avec ces ARN (sans procéder à la RT) pour s'assurer qu'il ne restait pas de traces d'ADN. Le résultat a été négatif. Ceci permet donc de conclure que c'est bien de

l'ARN qui est amplifié et que, par conséquent, l'IN est toujours synthétisée. Il se peut que l'enzyme soit toujours présente, mais qu'elle soit défective. Bien que ces résultats ne correspondent pas à notre hypothèse de départ, stipulant que les ODN mutagènes devaient engendrer des mutations qui devaient arrêter la synthèse de l'enzyme, nous obtenons tout de même des particules virales défectives.

Il se peut que des mutations soient présentes dans la séquence codante de l'intégrase, l'affectant dans ses fonctions, mais n'inhibant pas sa synthèse. Des analyses du génome par séquençage permettront donc de vérifier cette nouvelle hypothèse.

### 10.3 Analyse des protéines totales des cellules traitées aux ODN



**Figure 10.2** Analyse des protéines totales des cellules traitées aux ODN par Western blot.

#### Légende

1= NIH NE8	10= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE32, 1,34 uM
2= NIH	11= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE33, 1,34 uM
3= NIH infectées par Cas-Br-E jour 24 de l'infection	12= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE34, 1,34 uM
4= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32WT, 2 jours après l'infection, jour 18	13= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE32, 1,34 uM, jour 85
5= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32, 2 jours après l'infection, jour 18	14= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE33, 1,34 uM, jour 85
6= NIH infectées par Cas-Br-E jour 18 de l'infection	15= NIH NE8 6 <sup>e</sup> traitement ODNEE34, 1,34 uM, jour 85
7= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec liposome, 1 heure après l'infection, jour 12	16= NIH infectées par Cas-Br-E jour 12 de l'infection
8= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEEZeoR, 1 heure après l'infection, jour 12	17= NIH NE8
9= NIH infectées par Cas-Br-E et traitées avec ODNEE32. 1 heure après l'infection, jour 12	18= NIH

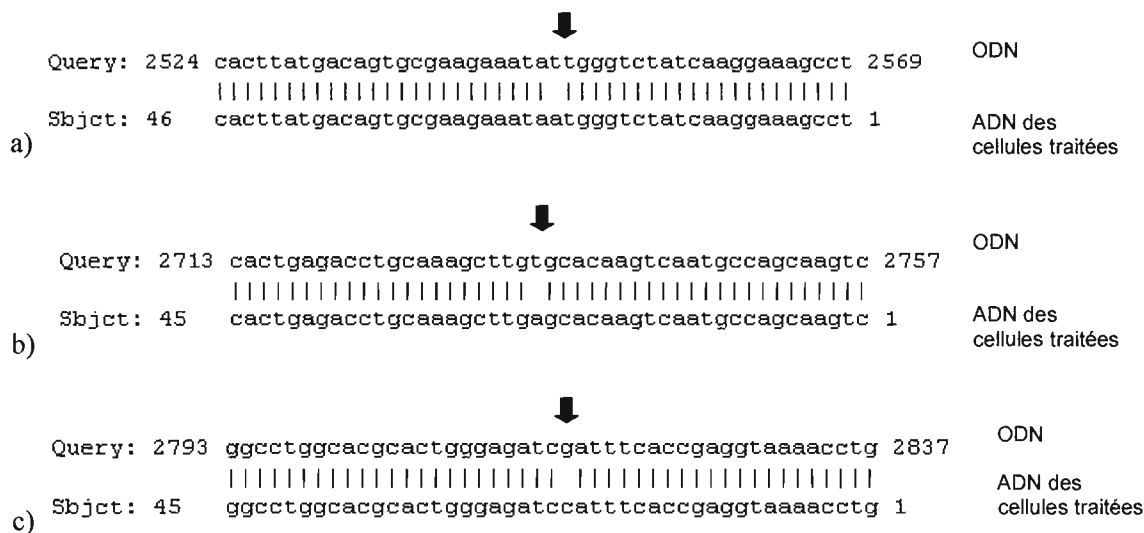
L'analyse des protéines totales a été effectuée avec un anticorps dirigé contre l'intégrase et la transcriptase inverse. La figure 10.2 démontre par Western blot que la RT est toujours présente et que, tout comme les tests rAdT l'ont démontré, quels que soient les traitements appliqués, aucun effet n'est notable. Cependant, l'IN aussi est toujours présente. Ceci est inattendu puisque les ODN doivent théoriquement arrêter la synthèse de l'IN. Ici aussi, peu importe les traitements appliqués, le type d'ODN, la dose et le nombre de répétitions, il ne semble pas y avoir d'altération dans l'expression de l'IN. Cependant, il est possible que les anticorps utilisés ne permettent pas de détecter la présence de petit peptide de l'intégrase. Contrairement au traitement avec l'ODN mutagène EE34 qui devrait engendrer une production de la séquence complète de l'IN, mais avec une substitution d'un acide aminé, les ODN mutagènes EE32 et EE33 introduisent un codon stop. Il est donc attendu que les traitements avec EE32 et EE33 induisent la production de petits peptides de la partie N-terminal de l'intégrase. Il est donc possible que les anticorps ne puissent pas détecter ces peptides.

## Chapitre XI

### Effets des traitements sur le génome des cellules traitées

#### 11.1 Analyse du génome par alignement des séquençages directs des produits de PCR

D'après notre hypothèse de départ; c'est-à-dire que les ODN mutagènes devaient introduire un codon stop (ODN EE32 et EE33) ou un changement d'acide aminé (ODN EE34) et ainsi mener à l'arrêt de la synthèse de l'IN ou à la présence d'un IN non fonctionnelle, la vérification des mutations au niveau du génome s'est avérée surprenante. L'alignement de la séquence du gène *pol* de l'intégrase du rétrovirus Cas-Br-E, avec les séquences obtenues par séquençage direct des produits de PCR, affichait un alignement parfait. Les ADN des cellules traitées aux ODN mutagènes (EE32, EE33 et EE34) étaient d'espèce sauvage puisque les alignements ne démontraient aucune mutation.



**Figure 11.1. Alignement des séquençages directs des produits de PCR avec chacun des ODN mutagènes.** La ligne du haut représente le résultat du séquençage des produits de PCR et en bas, il s'agit de la séquence de l'ODN mutagène. a) Alignement du séquençage direct du PCR-574-3 avec l'ODN EE32 b) Alignement du séquençage direct du PCR-574-6 avec l'ODN EE33 c) Alignement du séquençage direct du PCR-574-10 avec l'ODN EE34

À la figure 11.1, l'alignement des séquençages directs avec la séquence de l'ODN mutagène montre qu'il ne semble pas y avoir de mutation introduite dans le génome des cellules traitées aux ODN mutagènes. En a), il s'agit de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec une dose de 1,34 uM une fois par semaine, durant 6 semaines et cultivées durant plus de 75 jours. La mutation qui devait être induite est le changement d'un T en A (flèche noire). En b), il s'agit de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE33 traitées 6 fois avec 1,34 uM et cultivées durant 75 jours. La mutation qui devait être induite est également le changement d'un T en A (flèche noire). Et finalement, en c), il est question de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE34 avec une dose de 1,34 uM, une fois par semaine, durant 5 semaines. Ici, la mutation qui devait être induite est le changement d'un G en C (flèche noire). Ces résultats démontrent qu'il n'y a pas de mutation au niveau du génome, en dépit du fait que le surnageant de ces cellules ait été titré à zéro.

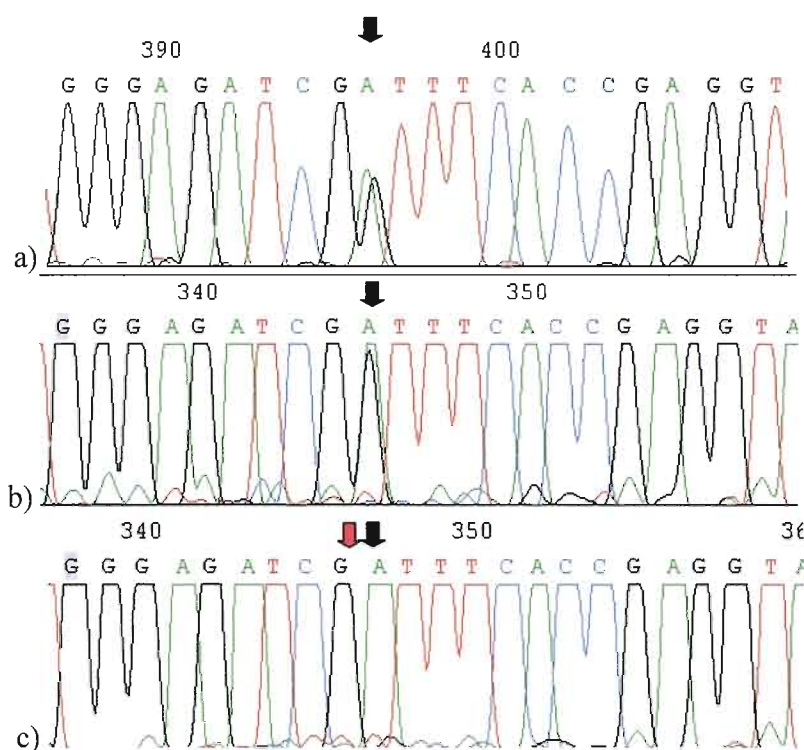
Par contre, en consultant les chromatogrammes de ces séquençages directs, un mélange de l'ADN sauvage et de l'ADN contenant des mutations est clairement notable. Ainsi, 53,8 % (7/13) des chromatogrammes des séquençages directs affichent des mélanges au niveau d'une ou même plusieurs bases.

## **11.2 Analyse du génome par séquençage direct des produits de PCR**

### **11.2.1 Analyse de l'ADN**

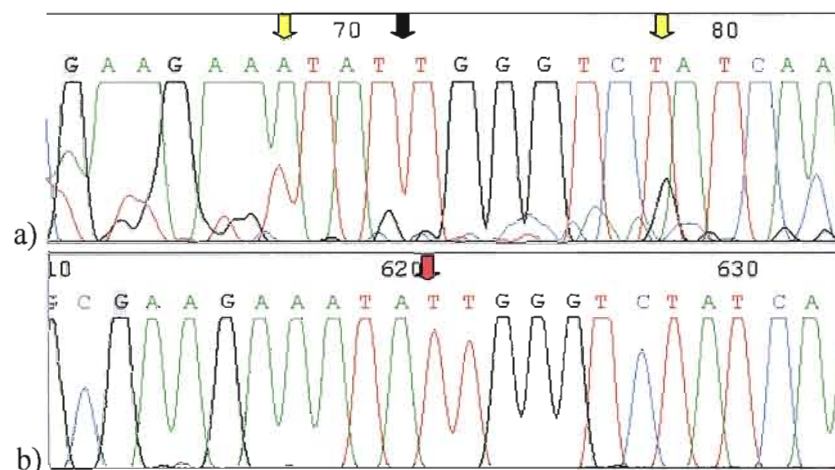
Le séquençage direct des produits de PCR a permis de mettre en évidence qu'il y a un mélange au niveau de l'ADN, soit un mélange d'ADN sauvage et d'ADN contenant une base mutée. Les mutations touchent la base ciblée et sur celle d'à côté, ainsi que sur les nucléotides avoisinants la base ciblée. En effet, la dizaine de nucléotides entourant la base qui est ciblée par l'ODN mutagène semble présenter une certaine ambiguïté.





**Figure 11.2** Chromatogrammes des séquençages directs des produits de PCR démontrant un mélange d'ADN de type sauvage et muté. a) PCR-574-10 amorce CasIN-1, mélange GAT/GGT très net b) PCR-574-10 amorce CasIN-49, mélange GAT/GGT très net c) PCR d'ADN de type sauvage.

À la figure 11.2, le séquençage du PCR des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE34 avec une dose de 1,34  $\mu\text{M}$ , une fois par semaine, durant 5 semaines, démontre un mélange GAT/GGT très évident. Ce mélange est d'ailleurs confirmé dans les deux sens par les deux amorces utilisées pour le PCR. L'ODN EE34 est un oligonucléotide antisens (du début de la séquence de l'intégrase du Cas-Br-E, position 4953-4997 de X57540) avec une substitution non sens à la position 4976, soit un G (flèche rouge) en C, changeant une asparagine en histidine. La mutation observée sur le chromatogramme (flèche noire), bien qu'elle soit présente sur la base suivant celle qui est théoriquement ciblée par l'ODN EE34, engendre tout de même un changement de asparagine du triade catalytique DDE en glycine.

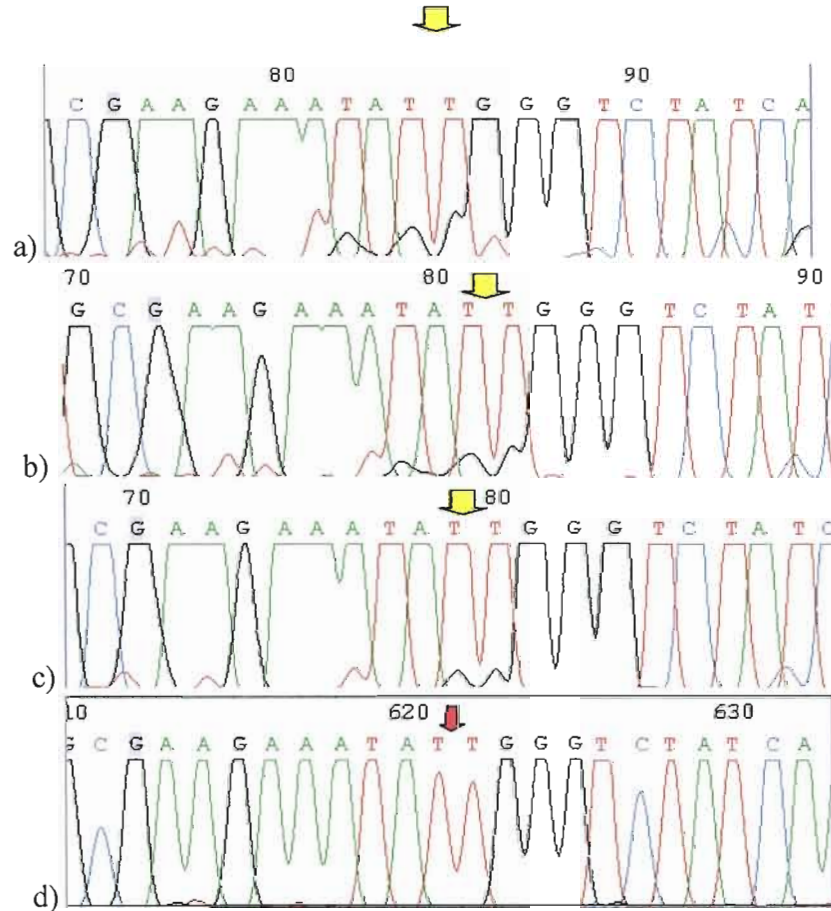


**Figure 11.3** Chromatogrammes des séquençages directs des produits de PCR démontrant des zones d'ambiguïté. a) PCR-574-3 b) PCR d'ADN de type sauvage

À la figure 11.3, il est notable que toute la zone entourant la base théoriquement ciblée est ambiguë : ceci n'est toutefois pas dû à un mauvais séquençage car la séquence en amont et en aval de cette dizaine de nucléotides est très nette et claire. Les cellules ont été traitées avec l'ODN EE32, un oligonucléotide antisens du début de la séquence de l'intégrase du Cas-Br-E (position 4684-4728 de X57540), qui devrait théoriquement engendrer une substitution non sens, un T (flèche rouge) en A, à la position 4708. Cette mutation devrait engendrer la formation d'un codon stop. En a), où il s'agit de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec une dose de 1,34  $\mu\text{M}$  une fois par semaine, durant 6 semaines et cultivées durant plus de 75 jours, il y a présence d'un pic de G entre les deux T de TATT (flèche noire). Si c'était le G qui était majoritaire, cette mutation engendrerait le changement d'un TAT en TAG, donc formation d'un codon stop.

De façon plus générale, il est remarquable que la région de la base ciblée semble posséder un mélange d'espèce (flèches jaunes). Le premier mélange, où il y a un pic de T au niveau du TAT (donnant GAT), est également décelable dans l'ARN de ces cellules, de même que dans les ARN des cellules NIH NE8 ayant été traitées avec le même ODN, le EE32, selon différentes doses (3,35  $\mu\text{M}$  et 4,02  $\mu\text{M}$ ). Cette mutation, si elle était majoritaire, engendrerait le changement d'une isoleucine en leucine. Le deuxième mélange au niveau du TAT (donnant GAT) est aussi détectable au niveau de l'ARN de ces cellules et engendrerait le changement d'une tyrosine en asparagine s'il était majoritaire.

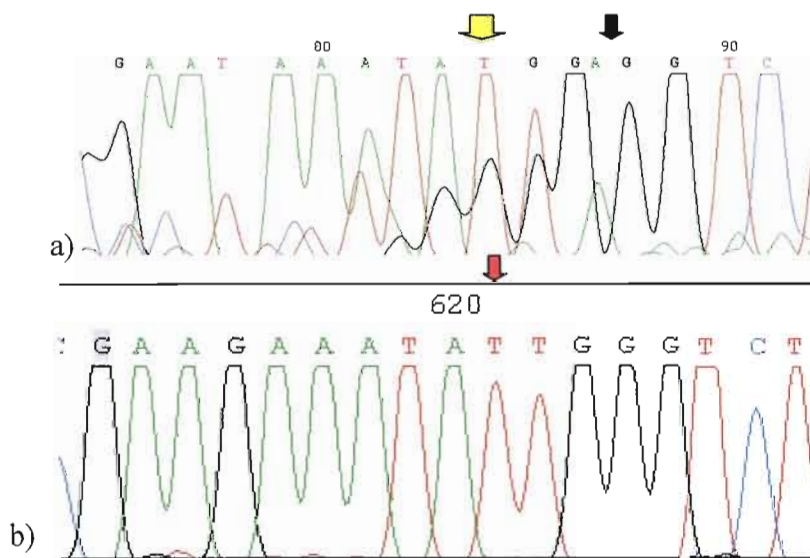
### 11.2.2 Analyse de l'ARN



**Figure 11.4** Chromatogrammes des séquençages direct des produits de RT-PCR. a) RT-PCR-581-4 b) RT-PCR-581-5 c) RT-PCR-581-11 d) PCR d'ADN de type sauvage

La figure 11.4 montre la présence d'un mélange au niveau du codon TAT (flèches jaunes), le codon qui est justement ciblé par l'ODN EE32 (flèche rouge). Les ARN des cellules NIH NE8, traitées avec l'ODN EE32, ont été extraits, traités à la Dnase et une RT-PCR a été effectuée. En a) et en b), qui sont des ARN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32, soit un seul traitement de 3,35  $\mu$ M et de 4,02  $\mu$ M respectivement, il y a apparence d'un mélange T/G-A-T/G-T/G au niveau de TAT. En c), où il est question de l'ARN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec une dose de 1,34  $\mu$ M une fois par semaine, durant 6 semaines, et cultivé durant plus de 85 jours, il y a un mélange de T/G-A-T/G-T/G.

Les mêmes mutations qui ont été trouvées au niveau de l'ADN se retrouvent au niveau de l'ARN. En effet, en se référant à la figure 11.3 a), où une PCR a été effectuée avec l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec une dose de 1,34  $\mu$ M une fois par semaine, durant 6 semaines, et cultivées durant plus de 75 jours, il y a aussi présence d'un pic de G entre les deux T de TATT.

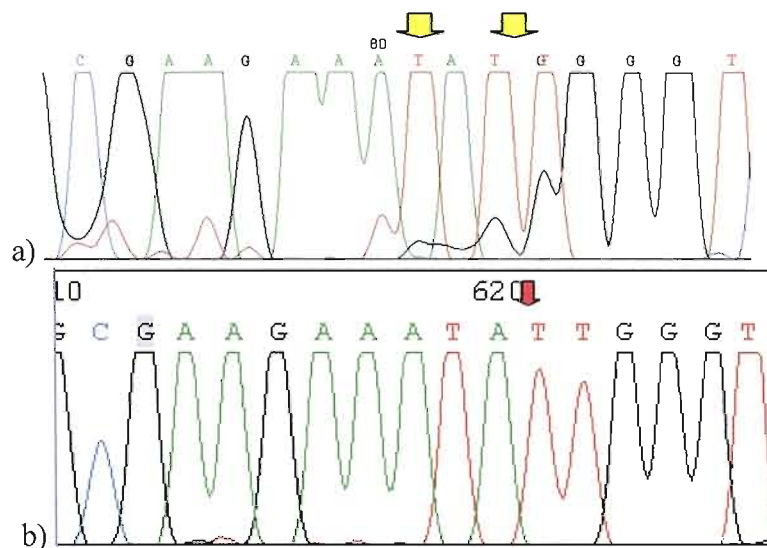


**Figure 11.5** Chromatogrammes des séquençages directs des produits de RT-PCR. a) RT-PCR-585-2 b) PCR d'ADN de type sauvage

À la figure 11.5 a) où il s'agit d'une PCR nichée après RT-PCR de l'ARN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec un seul traitement de 2,01  $\mu$ M, il y a une insertion d'un A entre deux G (flèche noire). L'insertion de ce A pourrait être due à l'introduction d'erreurs par la Taq polymérase lors de la PCR, plutôt que par l'action de l'ODN EE32. Afin de s'en assurer, il aurait fallu envoyer au séquençage la RT-PCR avant de faire la PCR nichée, mais la quantité de matériel était insuffisante. Cependant, cette même mutation (enfin, le remplacement d'un G par un A) se retrouve dans un clone (figure 11.8) provenant d'ADN de cellules NIH 3T3 infectées puis traitées avec l'ODN EE32.

Il y a aussi présence d'un mélange au niveau de ATATT (flèche jaune), contenant le codon qui est visé par l'ODN EE32 (flèche rouge). Ces mélanges soient le TAT pouvant donner GGG ou GAT ou TGT ou TGG ou TAG ou encore le codon TGG pouvant donner

GGA ou TGA. Ce mélange se retrouve également, tel que montré à la figure 11.4, avec les ARN des autres doses dépendantes ainsi qu'avec les ARN et ADN des cellules NIH NE8 traitées 6 fois et cultivées plus de 75 jours.



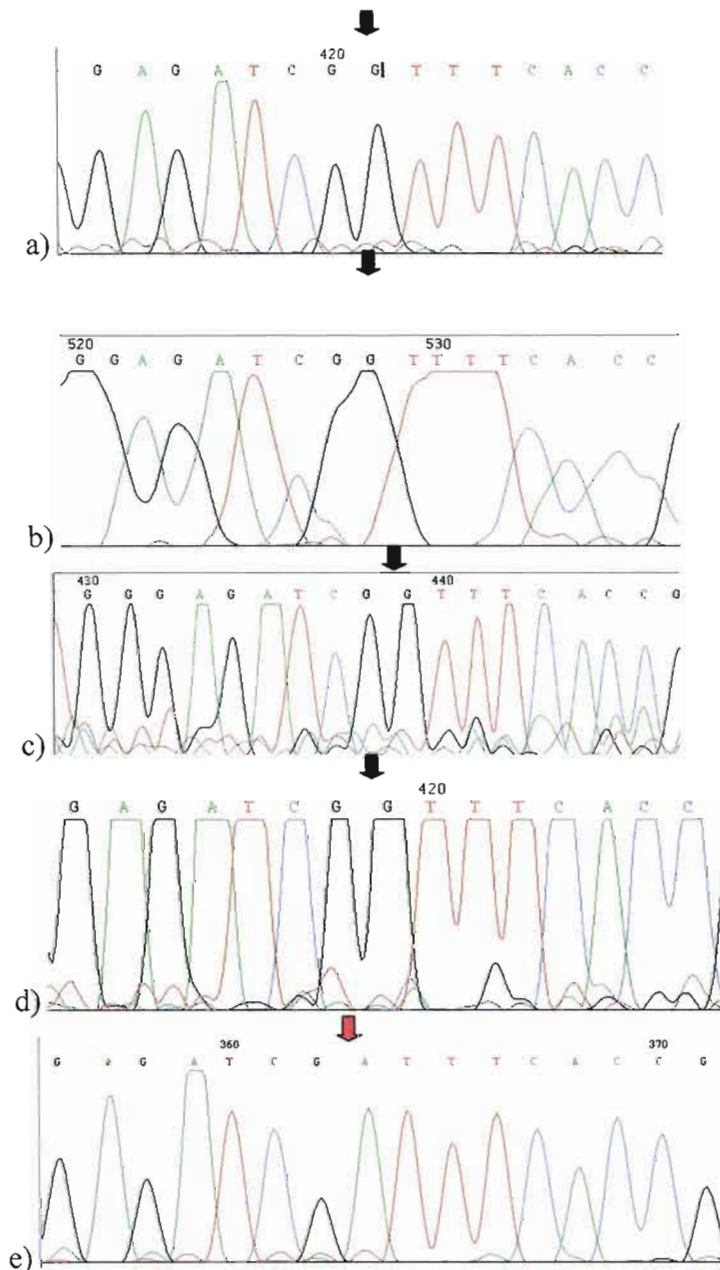
**Figure 11.6** Chromatogrammes des séquençages directs des produits de RT-PCR. a) RT-PCR 581-19 b) PCR d'ADN de type sauvage.

À la figure 11.6, il est question de l'ARN des cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées par l'ODN EE32 avec une dose de 1,34  $\mu\text{M}$  au 16<sup>e</sup> jour de l'infection, les cellules ont ensuite été cultivées durant 23 jours. Ici encore, comme aux deux figures précédentes, il y a un mélange au niveau du ATATT, contenant le codon visé par l'ODN EE32. Un premier mélange au niveau du codon TAT, pouvant donner GGG ou TGG ou GAT engendrant donc le changement d'une tyrosine (TAT) en possiblement une glycine (GGG) ou tryptophane (TGG) ou tryptophane ou asparagine (GAT) et bien sur aussi la possibilité d'un codon stop soit le TAT qui deviendrait un TAG. Un deuxième mélange au niveau du codon suivant le TGG qui pourrait être GGG ce qui engendrerait le changement d'une tryptophane en glycine.

Les résultats présentés dans ces deux dernières sections ne font mention que des ODN mutagènes EE32 et EE34. Les séquençages pour les cellules traitées avec l'ODN EE33 n'ont pas bien fonctionnés. Le temps pour refaire les PCR et les séquençages a ensuite manqué, mais ces tests devront être refaits.



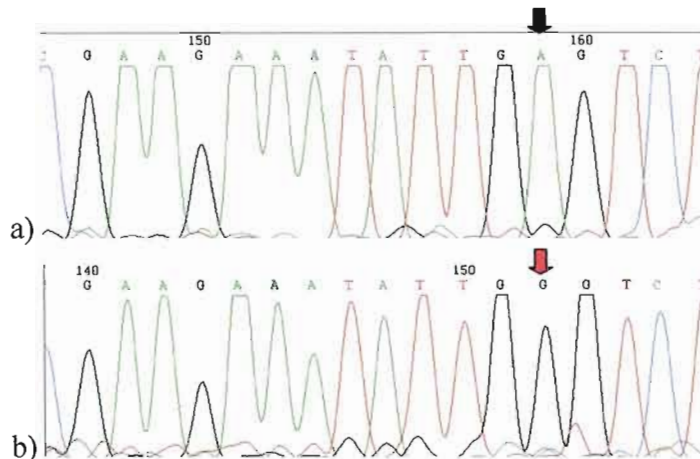
### 11.3 Analyse du génome par séquençage des clones des produits de PCR



**Figure 11.7** Chromatogramme des séquençages des clones obtenus par clonage dans le vecteur pDrive du PCR de l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE34 avec une dose de 1,34  $\mu$ M une fois par semaine, durant 5 semaines. a) clone 430-T7 b) clone 428-sp6 c) clone 426-T7 d) clone 429-T7 e) PCR d'ADN de type sauvage.

Une approche par clonage a été adoptée afin d'isoler les espèces d'ADN qui possèdent une mutation. Le clonage a permis de démontrer clairement la présence d'une mutation (figure 11.7) dans l'ADN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE34 avec une dose de 1,34  $\mu$ M une fois par semaine, durant 5 semaines. La mutation (le changement d'un A en G) a été trouvée dans 62,5% des clones (5 des clones sur les 8, provenant de ce PCR dont l'ADN avait préalablement été digéré). Cependant, tel que mentionné précédemment, la mutation se retrouve sur la base à côté de celle qui est visée. La mutation obtenue engendre un changement d'un résidu asparagine (GAT) en glycine (GGT). Les clonages avec d'autres produits de PCR se sont avérés cependant moins efficaces, faisant baisser ce taux à 20,8 % (5/24) de mutants. Le clonage d'autres produits de PCR, PCR ayant été effectué avec l'ADN non digéré par les enzymes de restriction propres à chacun des ODN mutagènes, s'est avéré beaucoup moins intéressant. Sur les 21 clones envoyés, seulement un possédait une mutation (figure 11.8), donnant un faible 4,8% de clones avec une mutation (contre le 20,8 % précédemment obtenu).

Ces faibles taux pourraient avoir peut-être pu être augmentés en digérant l'ADN des cellules traitées avec leurs enzymes spécifiques avant d'effectuer la PCR. Tel que mentionné précédemment, la digestion des ADN permet d'augmenter la proportion d'ADN mutant puisque l'enzyme coupe l'ADN non muté. Le nombre de mutants trouvés par clonage est de 20,8 %, contre 4,8 % pour les clonages effectués avec des produits de PCR dont l'ADN n'a pas été préalablement digéré.



**Figure 11.8** Chromatogramme des séquençages des clones obtenus par clonage dans le vecteur pDrive du PCR de l'ADN des cellules NIH 3T3 infectées par les virus Cas-Br-E et traitées 5 fois, à toutes les semaines avec 1,34  $\mu$ M de l'ODN EE32. a) clone AS17-A5-18-T7 b) PCR d'ADN de type sauvage

Pour les cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées avec 1,34  $\mu$ M de l'ODN EE32 aux jours 28, 40, 47, 54 et 61 post infection et cultivées trois semaines, il y a une mutation d'un G en A (flèche noire) comme ce qui avait été noté à la figure 11.5. Dans celle-ci, le séquençage direct de la RT-PCR de l'ARN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32 avec un seul traitement de 2,01  $\mu$ M semblait afficher l'insertion d'un A entre les deux G. Ce changement de codon TGG en TGA engendre un codon stop.

Les séquences obtenues avec l'ADN des cellules traitées avec les contrôles (l'ODN EE32WT, l'ODN EEZeoR et le liposome utilisé seul) ne contiennent aucune mutation. De plus, aucun des chromatogrammes ne démontre de mélanges de nucléotides. En ce qui a trait aux clones obtenus de ces PCR, aucun d'entre eux n'affichaient de mutations. Des 6 clones pour l'ODN EEZeoR, 6 clones pour la Lipofectamine 2000 et 20 clones pour l'ODN EE32WT envoyés au séquençage, aucun n'avait de mutation dans la séquence, donc 0 % de mutant trouvé.



## **PARTIE DISCUSSION**

### **Chapitre XII**

#### **Analyse de l'effet des traitements sur les cellules**

##### **12.1 Effets des ODN modifiés sur les cellules NIH NE8, chroniquement infectées par Cas-Br-E MuLV**

Nos ODN contiennent des bases phosphorothioates, qui permettent une plus grande résistance aux digestions par les nucléases, les préservant ainsi de la dégradation et augmentant leur durée de vie et leur stabilité (Liu et *al*, 2002). Ceci s'avère d'ailleurs évident lorsqu'on se réfère à la figure 7.1, où est comparée l'efficacité d'un ODN mutagène contenant des bases phosphorothioates avec un ODN mutagène de même séquence mais, sans les bases Ps. Bien que ceci soit amplement documenté (Vickers et *al*, 1991 et Liu et *al*, 2002), les différences rencontrées sont impressionnantes. L'ajout de modifications phosphorothioates apparaît donc comme primordial pour l'efficacité du traitement. Ainsi, 4 traitements de faibles doses (1,34  $\mu$ M) de l'ODN EE34 sont suffisants pour inhiber pratiquement toute la production de virus infectieux, alors que 4 traitements avec l'ODN EE34 sans modification Ps ont un effet très limité sur la production virale.

Le ratio ODN : liposome est aussi un élément important en ce qui a trait à l'efficacité des traitements. Nos tests d'optimisation ont permis de conclure qu'un ratio de 1 : 1 était le plus adéquat. Les liposomes cationiques forment des complexes avec l'ODN à travers des forces électrostatiques. Les complexes obtenus peuvent être préparés de façon à ce qu'ils contiennent des charges positives en excès, permettant une interaction adéquate avec la membrane plasmique, négativement chargée. La détermination des quantités idéales est un élément non négligeable.

Les récents avancements dans le domaine *in vivo*, notamment au niveau des cellules épithéliales de poumons, démontrent que la composition lipidique du liposome cationique, de même que le ratio liposome cationique : ODN, est très important. Aussi, une modification minime de ces rapports peut amener une amélioration drastique de la pénétration de l'ODN dans les cellules (Wilson et *al*, 2005).

### 12.1.1 Effet sur le titre des virus infectieux

En ce qui a trait à l'efficacité du traitement sur le titre des virus produits par les cellules traitées aux ODN mutagènes, il a été observé que les traitements engendraient une diminution et une inhibition de la production de virus infectieux, en fonction de la quantité d'ODN utilisée et du nombre de répétitions du traitement. En se référant à la figure 7.2, il est notable que 5 traitements de faibles doses (1,34  $\mu\text{M}$ ), à raison d'un traitement par semaine, sont suffisants pour inhiber complètement la production de virus infectieux. À la figure 7.3, un traitement de forte dose (4,01  $\mu\text{M}$ ) est aussi suffisant pour inhiber complètement la production de virus.

Les  $\text{IC}_{50}$  (tableau II) pour les ODN EE32, EE33 et EE34 s'équivalent et correspondent à environ 0,432  $\mu\text{M}$ . Ces valeurs de  $\text{IC}_{50}$  sont légèrement inférieures à celles qui ont été publiées pour l'utilisation d'oligonucléotides *in vitro*. Comme, par exemple, pour l'équipe de Lin et *coll.* (2000), qui a utilisé des oligonucléotides pour inhiber la croissance des cellules tumorales de foie de rat et ont obtenu une  $\text{IC}_{50}$  de 4  $\mu\text{M}$  lors de leurs expérimentations. En ce qui concerne l'intégrase, de courts oligonucléotides contenant des bases hétérocycliques 6-oxocytosine ont été utilisés pour inhiber l'intégrase de HIV-1 *in vitro*. Selon les ODN utilisés, les  $\text{IC}_{50}$  variaient entre 5 et 10  $\mu\text{M}$  (Brodin et *al.*, 2002). Donc, nous avons avec nos ODN mutagènes, des  $\text{IC}_{50}$  de 10 à 25 fois plus faibles que ce qui a été publié précédemment.

Les figures 7.4 et 7.5 présentent les résultats obtenus en mélangeant des ODN mutagènes différents et ne démontre pas d'effet additif apparent. Le mixte de deux ODN constitué de 0,67  $\mu\text{M}$  de chacun agit comme un traitement de 0,67  $\mu\text{M}$  plutôt que comme un traitement de 1,34  $\mu\text{M}$ . Il en va de même pour l'utilisation de trois ODN mutagènes. Ces résultats étaient attendus puisque chacun des oligonucléotides cible le même gène mais à un endroit différent. En fait de but était d'accumuler plusieurs mutations dans la séquence de l'IN (des séquençages du génome de ces cellules sont à faire).

### 12.1.2 Effet sur la production de virus et l'activité de la transcriptase inverse

Les figures 7.6 et 7.7 montrent très clairement que la transcriptase inverse est toujours active. En dépit du fait que les cellules NIH NE8 ont un titre de zéro après 6 traitements de

1,34  $\mu\text{M}$  ou un seul de 4,02  $\mu\text{M}$ , l'activité de la RT n'est pas affectée par les ODN mutagènes. Que ce soit avec l'ODN mutagène EE33 ou avec les contrôles ODN, EE32WT et EEZeoR et le liposome, aucune différence n'est observée. La présence de RT permet aussi de conclure que le traitement permet toujours la production de particules virales mais non infectieuses.

Plusieurs études ont rapporté que des mutations dans l'intégrase peuvent engendrer des anomalies au niveau de l'assemblage du virion, de la production, de la maturation et de la composition des protéines, de même que dans la formation du PIC. Cependant, d'autres virus mutants de l'intégrase, obtenus par le biais de délétion dans le domaine N-terminal ou des mutations dans le motif HHCC, ne sont pas affectées dans le processus protéolytique, la composition protéique des virions, l'encapsidation de l'ARN génomique et l'activité de la RT associé au virion (Engelman et *al*, 1995, Masuda et *al*, 1995, Taddeo et *al*, 1994 et Wu et *al*, 1999).

Des analyses *in vivo* de la structure et de la fonction de l'intégrase de HIV ont suggéré que l'IN puisse assurer d'autres fonctions importantes du cycle viral. Il a également été trouvé que certaines mutations de l'IN altèrent la synthèse de l'ADN viral, sans pour autant avoir des effets apparents sur les étapes tardives du cycle viral. (Engelman et *al*, 1995 et Masuda et *al*, 1995). Plus encore, en dépit du fait que ces virus mutants fonctionnent normalement à ces étapes, des expériences ont démontré que ces virus produisaient de 10 à 20 fois moins d'ADN viral suite à l'infection (Leavitt et *al*, 1993 et Masuda et *al*, 1995).

## **12.2 Effet des ODN sur les cellules NIH 3T3 infectées par le virus NE8 et traitées à différent temps post-infection**

### **12.2.1 Effet sur le titre des virus infectieux**

Les expérimentations menées sur les cellules NIH 3T3 infectées et traitées par la suite sont en accord avec les résultats observés sur les cellules NIH NE8. Une répétition de plusieurs traitements de faibles doses (1,34  $\mu\text{M}$ ) est suffisante pour enrayer complètement l'infection et ce, même si l'infection est chronique (figure 8.3). Cependant, l'infection reprend le dessus s'il n'y a pas de répétition du traitement jusqu'à une inhibition complète de la production de particules virales infectieuses (figure 8.2).

Une inhibition de l'infection est également possible avec un seul traitement de faible dose (1,34 uM) ciblé dans les quatre premiers jours post-infection (figure 8.1). Au-delà de ce temps, une faible dose n'est pas suffisante. Cependant, un seul traitement de 4,02 uM est suffisant pour inhiber complètement la production de virus infectieux, même lorsque l'infection est chronique (figure 8.4). Les résultats obtenus par ce modèle expérimental corroborent ce qui a été obtenu avec le modèle des cellules NIH NE8 (lignée clonale possédant deux intégrations du virus NE8). Ces résultats permettent également d'évaluer l'efficacité du traitement dans le cadre d'une infection virale en temps réel, en fonction de la cinétique.

Il a été démontré qu'une petite dose, ciblée en début d'infection, est suffisante pour arrêter l'infection virale. Ces résultats sont forts encourageants si on les extrapole à HIV. Les traitements prophylactiques actuellement utilisés contre HIV correspondent à une dose unique de névirapine, un inhibiteur non nucléosidique de la RT, administrée le plus tôt possible, dans les premiers 72 heures suivant l'exposition. Ensuite, un traitement non interrompu de 28 jours, avec une combinaison d'inhibiteurs nucléosidiques de la RT (zidovudine, lamivudine) et un inhibiteur de protéase (nelfinavir), à prendre deux fois par jours, est indiqué. Tout comme la trithérapie pour les personnes séropositives, ces traitements ne sont pas sans effets secondaires. De la diarrhée (48%), de la fatigue (31%), des maux de tête (9%) et des dermatites (1%) ont été rapportés. Certains patients ont même dû arrêter le traitement en raison d'effets secondaires plus graves, tels que des symptômes sévères de diarrhée, de fatigue extrême, de même que des troubles hépatiques. Tous ces symptômes disparaissent avec la cessation du traitement. Entre les 3<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois suivant le traitement, 80% des patients ayant suivi correctement la thérapie, après avoir été contaminés par les sources positives, sont testés séronégatifs (Lin et *al*, 2005).

L'utilisation d'un traitement de première ligne avec nos ODN modifiés pourrait peut-être augmenter le taux de réussite des traitements prophylactiques existants actuellement. De plus, nos ODN pourraient peut-être permettre de réduire les doses des traitements, permettant ainsi de diminuer les effets secondaires. La répétition des traitements aux ODN est également avantageuse dans la mesure seront utilisées de faibles quantités d'ODN donc moins de toxicité et potentiellement moins d'effet secondaires pour les patients. Il est également à noter que le traitement peut cibler l'ADN intégré et non intégré.

### 12.3 Effet des traitements sur l'expression de l'intégrase

L'analyse de l'ARN par RT-PCR a permis de démontrer que l'ARN viral pleine longueur est toujours synthétisé (figure 10.1). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par Western blot (figure 10.2) où l'ARN viral est bien traduit, le « processing » n'est pas altéré et l'IN semble complète. Les traitements aux ODN mutagènes (EE32 et EE33) devraient théoriquement arrêter la synthèse de l'enzyme. Or, ce n'est pas ce qui est observé avec les western blot, même dans les cas où le titre viral est de zéro. Cependant, il est possible que les anticorps utilisés ne permettent pas de détecter les petits peptides de l'IN, tel qu'expliqué précédemment.

Il est aussi possible que des mutations soient présentes dans la séquence codante de l'intégrase, l'affectent dans ses fonctions, mais n'inhibent pas sa synthèse. Ainsi, il est envisageable que l'intégrase soit toujours synthétisée mais qu'elle soit défective. Elle pourrait présenter une tare au niveau de l'activité de multimérisation ou encore, certaines mutations pourraient l'empêcher de se lier adéquatement à l'ADN. Il serait important de faire des tests d'activités de l'intégrase des cellules traitées aux ODN mutagènes. Toutefois, il a été observé chez HIV que certains virus mutants de l'intégrase possédaient une activité de l'intégrase pratiquement normale en dépit du fait que les virus étaient non infectieux (Engelman et *al*, 1995).

### 12.4 Effets des traitements sur le génome des cellules traitées

#### 12.4.1 Analyse de l'ADN par séquençage direct des produits de PCR

Le séquençage direct des produits de PCR a permis de mettre en évidence qu'il y a un mélange au niveau de l'ADN. Ces mélanges se retrouvent sur la base ciblée et sur la suivante mais, aussi, sur la dizaine de nucléotides en aval et en amont de la base ciblée. En fait, toute la zone avoisinante semble être affectée par des mutations. La littérature recensée stipule qu'il peut effectivement y avoir une zone d'ambiguïté dans les quelques bases entourant le nucléotide ciblé. Cette zone, nommée « Hot Spot Mutation », peut contenir plusieurs mutations non désirées.

Lors de l'analyse du génome par séquençage direct, il a été observé que certains paramètres jouent, de façon significative, sur le pourcentage de mutants. Le fait d'avoir préalablement digéré l'ADN, avec les enzymes spécifiques à chacun des ODN mutagènes avant de procéder à la PCR, augmente le taux de mutation détecté. Par exemple, le nombre de mutants trouvés par clonage des produits de PCR est de 20,8 % contre 4,8 % pour les produits de PCR dont l'ADN n'avait pas été digéré. Également, la Taq polymérase, utilisée pour les RT-PCR plutôt que la Taq platinum (qui a été utilisée pour tous les PCR fait à partir de l'ADN), a permis d'observer un plus grand nombre de mutations. Ces mutations n'étant pas toujours confirmées au niveau de l'ADN, ceci laisse croire que ces mutations sont davantage reliées à des erreurs de la Taq polymérase qu'à l'effet des ODN mutagènes.

Ainsi, des mélanges d'espèces d'ADN ont été observés avec les séquençages directs des produits de PCR. En se référant à la figure 11.2, il est possible d'observer un mélange très évident de deux espèces d'ADN sur la base suivante de celle qui devait être théoriquement mutée. La mutation a d'ailleurs été confirmée dans les deux sens. L'ODN EE34 devait changer le G en C sur la base précédant le mélange. La mutation que nous avons obtenue donne un A en G (GAT changé en GGT, plutôt que le GAT en CAT qui aurait dû être obtenu), donc une asparagine en glycine (plutôt qu'une asparagine en histidine).

La littérature stipule qu'il est plus facile de changer un G en C qu'un A en T. En réalité, la conversion d'un G en C est obtenue avec une efficacité de trois fois supérieure à toute autre conversion (Alexeev et Yoon, 2000). Plus spécifiquement, les diverses conversions possibles se divisent en trois catégories : (i) les conversions avec un haut taux de réparation (T/G et C/A), (ii) celle avec un taux de conversion intermédiaire (C/T) et finalement (iii) la conversion avec un faible taux d'efficacité (G/A). Toutefois, il a été démontré que les taux de réparation pour les conversions A/G (celles que nous obtenons avec notre ODN EE34), C/T, A/A et T/T étaient particulièrement dépendantes de la composition des nucléotides entourant la séquence de la base ciblée (Andersen et *al*, 2002). Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas obtenu une fréquence plus élevée.

L'hypothèse de départ était d'engendrer une mutation qui aurait changé un acide aminé asparagine en histidine. L'acide aminé visé se situe dans le domaine catalytique de l'intégrase, qui est un domaine essentiel à son activité. Le changement obtenu engendre plutôt le changement de cette asparagine en glycine. Or, une mutation dans ce domaine rend



l'intégrase déficiente pour l'activité d'intégration (Taddeo et *al*, 1994). En dépit du fait que ce ne soit pas le changement d'acide aminé escompté, un changement est tout de même atteint par cette mutation et, par conséquent, doit agir négativement sur l'activité de l'enzyme.

À la figure 11.3, l'ambiguïté de la zone entourant la base ciblée est assez marquée. Ici encore, ce n'est pas la mutation désirée. L'ODN EE32 devrait théoriquement engendrer une substitution d'un T en A et donc le codon TAT devrait devenir TAA (un codon stop) or le TAT est plutôt changé en TAG, qui est tout de même un codon stop.

#### **12.4.2 Analyse de l'ARN par séquençage direct des produits de PCR**

De la même façon que pour les ADN, la même ambiguïté (un mélange T/G-A-T/G-T/G au niveau de TAT) est détectable au niveau des ARN des cellules traitées. Les mêmes anomalies au niveau du génome sont discernables dans l'ADN et l'ARN, notamment dans le cas des cellules NIH NE8 traitées 6 fois avec l'ODN EE32 et cultivé plus de 75 jours après arrêt du traitement. De plus, ces anomalies du génome se retrouvent dans plusieurs échantillons différents, dans les cellules NIH NE8 ayant subi avec un seul ou plusieurs traitements et dans les cellules NIH 3T3 infectées et traitées par la suite.

#### **12.5 Analyse du génome par séquençage des clones obtenus**

Une approche par clonage des produits de PCR a été utilisée afin d'obtenir des clones pour chacune des espèces d'ADN. Les résultats des clonages (figure 11.7) ont permis de démontrer clairement une mutation dans l'ADN des cellules traitées avec l'ODN EE34 (avec une dose de 1,34  $\mu$ M, une fois par semaine, durant 5 semaines). Un changement d'un A en G est observé dans 62,5% des clones. La mutation engendre un changement d'acide aminé, bien que ce soit la base à côté de celle qui était théoriquement visée qui est mutée, un changement d'une asparagine en glycine est observé pour tous les clones affichant une mutation. Cet acide aminé se situant dans le domaine catalytique de l'intégrase.

À la figure 11.8, où il est question des cellules NIH 3T3 infectées par le virus Cas-Br-E et traitées avec 1,34  $\mu$ M de l'ODN EE32 aux jours 28, 40, 47, 54 et 61 post infection et

cultivées trois semaines, il y a une mutation d'un G en A. Ce changement de codon TGG en TGA engendre un codon stop.

Afin de s'assurer que ces mutations et mélanges d'espèces d'ADN observés sont réellement attribuables aux ODN mutagènes, les ADN des cellules traitées avec les contrôles (ODN EE32WT et EEZeoR et le liposome) ont été analysés. Les séquences obtenues avec l'ADN des cellules traitées avec les contrôles ne contiennent aucune mutation. De plus, aucun des chromatogrammes ne démontre de mélanges de nucléotides. En ce qui a trait aux clones obtenus de ces PCR, aucun d'eux n'affichaient de mutations. Des 6 clones pour l'ODN EEZeoR, 6 clones pour la Lipofectamine 2000 et 20 clones pour l'ODN EE32WT envoyés au séquençage, aucun n'avait de mutation dans la séquence, donc 0 % de mutant trouvé.

Ainsi, les contrôles ont permis de démontrer que les altérations détectées au niveau du génome ne sont pas dues à l'utilisation d'un oligonucléotide phosphorothioate de séquence non spécifique, non muté ou d'un liposome, mais sont vraiment attribuables à l'action de l'ODN mutagène lui-même.

Le faible taux de clones présentant une mutation amène à se questionner sur le mécanisme réel responsable de l'inhibition de la production de virus infectieux. Sur 8 clones provenant du PCR (effectué avec la Taq Platinum) de l'ADN des cellules NIH NE8 ayant été traitées 5 fois avec l'ODN EE34, 5 possédaient une mutation. Et, sur 21 clones des NIH 3T3 infectées et traitées plusieurs fois avec l'ODN EE32, seulement 1 possédait une mutation. Ce qui donne, en compilant ces données, un taux de mutant de 20,7 %.

Il faut toutefois mentionner que les résultats sont plus élevés lorsque l'ADN a été préalablement digérée par les enzymes de restrictions présentant des sites de restrictions dans la région ciblée par l'ODN mutagène. Cela a été le cas pour les 5 clones mutants sur les 8, contrairement au PCR de l'ADN des cellules NIH 3T3 infectées puis traitées par la suite, où l'ADN n'avait pas été préalablement digérée. Ceci explique probablement la grande différence de résultats obtenus lors des clonages. Tel qu'expliqué précédemment, les traitements sont supposés induire la perte d'un site de restriction. Donc après digestion de l'ADN des cellules traitées avec l'enzyme spécifique à l'ODN mutagène, s'il y a eu une mutation, le site est perdu et seulement l'ADN non muté est coupé. L'augmentation du taux de mutants, lorsque l'ADN a été préalablement digérée, est logique puisque l'utilisation de l'enzyme permet d'augmenter la quantité d'ADN muté car l'ADN sauvage est tout simplement coupé par l'enzyme.



Le fait que des mutations ou des mélanges soient observables au niveau de l'ADN, mais aussi de l'ARN, réfute l'idée d'un mauvais séquençage ou d'erreurs au niveau du PCR (car la Taq polymérase Platinum a été utilisée pour tous les PCR effectués à partir de l'ADN). À la figure 11.2, le fait que le mélange soit très évident et ce, avec les deux amorces utilisées, réfute l'hypothèse d'un mauvais séquençage. En se référant aux figures 11.3 a) et 11.4, qui correspondent au PCR et RT-PCR des cellules traitées avec l'ODN EE32, il est notable que des mélanges au niveau de la séquence TATT se retrouvent sur tous ces chromatogrammes, que ce soit avec les expériences de dose dépendance avec un seul traitement ou, encore, avec des cellules qui ont subi plusieurs traitements durant des semaines. Ainsi, les mutations se confirment au niveau de l'ADN et de l'ARN. Les RT-PCR, effectuées avec la Taq polymérase, présentent les mêmes mélanges qui ont été trouvés au niveau de l'ADN. La RT-PCR de l'ARN des cellules NIH NE8 traitées avec l'ODN EE32, avec un seul traitement de 2,01 uM, affiche une mutation : l'insertion d'un A entre deux G figure 11.5a). Cette insertion, bien qu'elle ne se retrouve pas dans les autres ARN traitées avec l'ODN EE32, se confirme dans un clone dont la PCR a été effectuée avec de l'ADN des cellules NIH 3T3 infectée par le virus Cas-Br-E et traitées avec 1,34 uM de l'ODN EE32 aux jours 28, 40, 47, 54 et 61 post infection et cultivées trois semaines (figure 11.8).

Il est possible que le faible taux de mutants trouvés par les clonages des produits de PCR soit dû au fait que la mutation n'est présente que sur un allèle. Ceci avait été le cas avec des expériences menées sur des mélanocytes de souris albinos. L'ODN utilisé pour cibler le gène de la tyrosinase, une enzyme clé dans la synthèse de la mélanine, s'était avéré efficace pour corriger la mutation inactivante du gène et la correction avait été notée au niveau de l'ADN, l'ARN et des protéines. Cependant, seulement un des deux allèles possédait la mutation. Même si la correction n'était présente que sur un seul allèle, un changement dans la pigmentation des cellules avait été observé (Alexeev et *al*, 2002). La même situation se répète peut-être dans notre cas.

Ainsi peut-être que la mutation engendrée par nos ODN mutagènes n'a ciblé qu'un seul brin. L'approche par clonage n'est alors pas nécessairement la meilleure voie pour voir de telles mutations. Il est probable que la bactérie dans laquelle sont clonés les fragments hétéroduplexes corrige l'erreur, diminuant ainsi la fréquence de mutation trouvée. Cependant, pourquoi serait-ce la mutation plutôt que le nucléotide sauvage qui serait préférablement

corrigée? Alors, même si c'était une possibilité, cela ne devrait pas avoir d'impact sur le taux de mutation détecté puisqu'il n'y pas de raisons pour que la bactérie répare préférentiellement l'ADN muté plutôt que le sauvage.

Toutefois, le séquençage direct constitue tout de même une meilleure approche, car il permet de mettre en évidence un mélange d'espèces d'ADN. C'est effectivement ce qui est détectable au niveau des séquençages directs des produits de PCR. En analysant tous les chromatogrammes des séquençages directs, environ 53,8 % des PCR montrent un mélange au niveau des nucléotides entourant la zone ciblée.

## **Chapitre XIII**

### **Analyse du pouvoir infectieux des virus produits par les cellules traitées**

#### **13.1 Effet des traitements sur les virus produits par les cellules NIH NE8 traitées**

Afin de confirmer les résultats obtenus par les titrations en immunofluorescence, des cellules NIH 3T3 ont été infectées par les surnageants de culture cellulaire des cellules NIH NE8, traitées aux ODN mutagènes et dont le titre est de zéro. La figure 9.1 démontre qu'aucune infection n'est discernable pour les cellules infectées par ces surnageants (celui des cellules NIH NE8 traitées avec une dose de 1,34  $\mu$ M, à raison d'une fois par semaine durant 6 semaines et cultivées durant 75 jours après l'application du dernier traitement). Les cellules NIH 3T3 infectées se comportent de façon similaire au contrôle négatif, par opposition aux cellules qui sont infectées par le surnageant des cellules NIH NE8 n'ayant pas été traitées aux ODN mutagènes. Des titrations en immunofluorescence de ces infections ont également corroboré ces résultats de dosage de l'activité de la RT. Des titres viraux de zéro ont été observés pour les cellules NIH 3T3 infectées par les surnageants de culture cellulaire des cellules NIH NE8 traitées aux ODN mutagènes, contrairement à un titre de  $7,8 \times 10^4$  FFU/ml pour les cellules infectées par les virus des cellules NIH NE8 non traitées.

Ces résultats permettent d'affirmer que les virus produits par les cellules NIH NE8 traitées aux ODN mutagènes sont non infectieux. Ainsi, non seulement les virus sont d'infecter d'autres cellules, mais lorsque les cellules infectées mourront, l'infection prendra fin.

## Chapitre XIV

### Mécanismes d'action des ODN mutagènes ciblant l'intégrase

#### 14.1 Mécanisme potentiel des ODN autre que la chiméraplastie

À première vue, il pourrait être envisageable que l'effet inhibiteur des ODN mutagènes ne soit dû qu'à une toxicité du traitement. Cependant, les ODN ou le liposome n'apparaissent pas comme étant nocifs pour les cellules traitées. En se référant aux résultats obtenus par titration en immunofluorescence et aux dosages de l'activité de la transcriptase inverse, il est évident que l'effet inhibiteur des ODN mutagènes n'est pas lié à un effet toxique. Les contrôles (ODN EE32WT, ODN EEZeoR et le liposome), quel que soit le nombre de répétitions des traitements ou les doses utilisées, n'ont aucun impact sur la production de virus infectieux.

Les résultats obtenus avec l'ODN EEZeoR et le EE32WT permettent de conclure que l'effet des ODN mutagènes est vraiment attribuable à leur séquence et à la présence de mutation qu'ils engendrent. Les voies de réparation de l'ADN peuvent agir positivement et négativement sur les étapes précoces de la réplication et sur les éléments qui y sont requis. Différents mécanismes de réparation existants dans les cellules peuvent être sollicités pour la réparation des gènes : la voie de réparation des mésappariements (MMR), la voie de réparation par excision de nucléotide (NER) et la voie de réparation par excision de base (Andersen et *al*, 2002). L'activation des gènes de réparation de l'ADN altéré et le mécanisme de réparation de nucléotide par excision sont des éléments significativement augmentés autour de la zone où il y a eu un gène altéré (Gursel et Bushman, 2005). Le fait d'ajouter un simple ODN, quel que soit sa séquence, aurait pu activer certains mécanismes de réparation ou activer des gènes de réparation de l'ADN. La simple présence d'un ODN aurait peut-être pu engendrer une inhibition au niveau d'une des étapes du cycle viral ou, encore, provoquer l'apoptose des cellules infectées. Cette possibilité est toutefois écartée, en raison des ODN contrôles EE32WT et EEZeoR, qui n'ont aucun effet sur la réplication virale, quel que soit la quantité ou le nombre de répétitions des traitements.

Ces résultats permettent également de réfuter l'idée que l'effet inhibiteur des ODN mutagènes résulte d'un mécanisme antisens bloquant la traduction. En effet, l'ODN contrôle EE32WT n'a pas d'effet sur la production virale. De plus, une fois l'infection enrayée complètement, l'inhibition totale de la production de virus infectieux est maintenue (les cellules NIH NE8 traitées ont été laissées en culture plus de 75 jours après le dernier traitement). Ceci réfute également la possibilité d'un effet antisens, car un tel effet ne pourrait pas perdurer durant autant de temps. En ce qui a trait au contrôle liposome utilisé seul, ici aussi, aucun effet sur la production virale n'est décelé. Ainsi, les cellules traitées avec les contrôles produisent toujours une quantité significative de virus infectieux.

#### **14.2 Possibilité d'un effet dominant négatif**

La fréquence des mutations obtenues reste cependant très faible. Est-ce tout simplement un problème de détection de la mutation ou alors est-ce parce que les ODN mutagènes font appel à un autre mécanisme que la chiméraplastie? La littérature stipule que des mutations dans l'intégrase de HIV-1, au niveau des domaines C-terminal et N-terminal, peuvent avoir un impact sur le pouvoir infectieux des virus. (Engelmen et *al*, 1992, Leavitt et *al*, 1993 et Brown, 1997). Cependant, c'est la région centrale, contenant les résidus acides invariables D64, D116, et E152, qui est la plus critique. Les expérimentations *in vitro* menées par Taddeo et *coll.* (1994) ont démontré que la mutation de n'importe quelle partie de ces résidus cause une perte de l'activité de l'intégrase (Wu et *al*, 1999). Des mutations dans le domaine C-terminal ont donné des résultats pour le moins surprenants : bien que l'activité de l'intégrase *in vitro* ne soit pas significativement affectée, une perte dramatique de l'infectiosité de ces virus mutants est quand même observée (Engelmen et *al*, 1995). Même si nous n'avons pas obtenu les mutations que nous attendions théoriquement, nous avons tout de même obtenu des mutations qui engendrent des changements d'acide aminé.

Il ne faut pas perdre de vue que l'intégrase est impliquée non seulement dans l'intégration mais aussi dans plusieurs étapes du cycle réplcatif du virus : l'assemblage du virion, la production, la maturation, la composition des protéines, de même que la formation du PIC (Shin et *al*, 1994, Engelman et *al*, 1995, Engelman, 1999 et Lai et *al*, 2001). Il a également été trouvé que certains virus mutants de l'intégrase peuvent tout de même être

normaux dans le processus protéolytiques, la composition protéique des virions, l'encapsidation de l'ARN génomique et l'activité de la RT associée au virion (Engelman et *al*, 1995, Masuda et *al*, 1995 et Wu et *al*, 1999). Et ce, en dépit du fait que l'activité de l'IN est altérée ou que ces virus sont incapables d'infecter d'autres cellules.

Il est probable qu'une légère altération puisse avoir des effets très importants sur les pouvoirs infectieux des virus produits; c'est ce qui expliquerait pourquoi nous obtenons des particules virales défectives. En effet, il serait possible que nos résultats soient vraiment dû à la chiméraplastie mais compte tenu de la faible fréquence de mutation, cet effet serait dominant-négatif. Il se peut que la synthèse, même d'une faible proportion de courts peptides de l'IN ou d'IN modifiée, puisse en s'associant à la protéine sauvage, affecter la fonction de l'IN. Car l'IN doit absolument être sous sa forme dimérique pour être fonctionnelle

## CONCLUSION

Ainsi, une diminution et une inhibition complète du titre viral sont obtenues par les traitements avec nos ODN mutagènes EE32, EE33 et EE34. Les virus produits par les cellules traitées (et dont le titre viral correspond à zéro) sont défectifs, n'étant plus capables d'infecter d'autres cellules. En ce qui a trait aux changements dans le génome, les séquençages directs des PCR mettent en relief un mélange d'espèces d'ADN. Cependant, les mutations trouvées ne se situent pas nécessairement sur la base théoriquement visée par l'ODN mutagène. Suite aux clonages, il y a induction de codon stop avec l'ODN EE32 ou un décalage du cadre de lecture dans certains cas. L'ODN EE34 engendre bien un changement d'acide aminé, mais pas celui qui était prévu en théorie. Toutefois, bien que ce ne soit pas les bases visées qui soient mutées, les mélanges ou mutations obtenus suite aux traitements avec les ODN mutagènes se retrouvent au niveau de l'ADN et de l'ARN. Même les cellules n'ayant subi qu'un seul traitement contiennent un mélange de séquences au niveau du gène de l'intégrase.

Les résultats observés au niveau de l'ARN et des protéines démontrent qu'il y a toujours présence d'ARN viral pleine longueur et que l'ARN viral est bien traduit en protéine et ce, en dépit du fait que les virus produits par les cellules traitées aux ODN mutagènes ont un titre de zéro.

L'approche par clonage a permis de trouver des mutants de l'intégrase qui possèdent une mutation sur une base. Cette mutation, observée suite au traitement avec l'ODN EE34, engendre un changement d'acide aminé, une asparagine (GAT) en glycine (GGT), cette mutation constitue un changement important puisqu'elle se situe au niveau du domaine central (domaine catalytique de l'intégrase) contenant le motif DD(35)E. Il est établi qu'une seule mutation sur un de ces résidus inhibe totalement l'activité catalytique de l'enzyme (Taddeo et *al*, 1994, Wu et *al*, 1999 et Cherepanov et *al*, 2000). Une autre mutation a été observée sur les cellules traitées avec l'ODN EE32, soit le changement d'un codon TAT en TAG, ce qui engendre, un codon stop. D'autres mutations ont également été noté au niveau du TAT (donnant GAT) ce qui engendrerait le changement d'une tyrosine en asparagine s'il était majoritaire. La région ciblée par l'ODN EE32 est le domaine N-terminal de l'intégrase. Le domaine N-terminal est nécessaire aux interactions protéine-protéine et contribue à la reconnaissance spécifique des extrémités d'ADN (De Soultrait et *al*, 2002). Ce domaine possède un motif en pseudo doigt de zinc et la fixation du zinc induirait l'oligomérisation de l'IN, menant alors à la formation d'un complexe multimérique actif (Deprez et *al*, 2000). Peut-être qu'une simple mutation dans ce domaine peut avoir des répercussions importantes au niveau de la multimérisation de l'enzyme, la rendant alors défective.

En dépit du fait que le mécanisme ne soit pas clairement élucidé, les ODN mutagènes de l'IN sont de véritable agents anti-viraux. Ils sont très efficace contre l'infection par le Cas-Br-E, pouvant l'inhiber complètement et leur effet est prolongé dans le temps, même lorsque le traitement est arrêté. De plus ils sont très peu toxiques.

### **Perspectives**

Certes, des études plus poussées seront nécessaires pour mieux définir les mécanismes responsables de l'inhibition de la production de virus infectieux. Il faudrait tester l'activité de l'intégrase des cellules traitées. L'utilisation des traitements *in vivo*, sur des souris infectées par Cas-Br-E (expérimentation actuellement en cours), à défaut d'élucider le mécanisme d'action engendrant l'inhibition, permettra peut-être de renforcer les résultats obtenus *in vitro*.

L'extrapolation d'une telle thérapie au niveau de l'humain soulève plusieurs perspectives. Des traitements similaires pourraient être utilisés pour des rétrovirus comme

HIV et HTLV. Il ne faut pas perdre de vue que l'utilisation de nos ODN mutagènes constituerait un traitement à utiliser en combinaison avec les autres thérapies déjà existantes. Ce traitement serait administré lorsque la charge virale est basse pour, dans un ultime but, éliminer les cellules réservoirs pour HIV.

Le ciblage de plus d'un gène par des ODN pourrait également être envisageable. Par exemple, pour le virus HTLV-I, l'intégrase pourrait être ciblée en association avec la protéine Tax, qui contrôle l'expression virale et joue un rôle dans l'immortalisation des cellules infectées (Gatza et *al*, 2003). D'autres protéines pourraient également être visées, celles de l'enveloppe (gp21 et gp46) notamment. En fait, toutes les étapes du processus d'entrée du virus dans les cellules, de même que le processus de maturation, sont des étapes qui pourraient être ciblées par des molécules. Dans le cas d'HIV, les protéines virales Vif, Rev ou la RNase H pourraient être des cibles intéressantes (Barbaro et *al*, 2005).



## BIBLIOGRAPHIE

AGARWAL, S. GAMPER, H. B., et KMIEC, E. B. 2003. Nucleotide replacement at two sites can be directed by modified single-stranded oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Biomol. Eng.*, vol. 20, p. 7-20

ALEXEEV, V. et YOON, K. 1998. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, p. 1343-1346.

ALEXEEV, V. et YOON, K. 2000. Gene correction by RNA-DNA oligonucleotides. *Pigment cell Res.*, vol. 13, p. 72-79.

ALEXEEV, V., IGOUCHEVA, O. et YOON, K. 2002. Simultaneous targeted alteration of tyrosinase and c-kit by single-stranded oligonucleotides. *Gene therapy*, vol. 9, p. 1667-1675.

ANDERSEN, M. S., SORENSEN, C. B., BOLUND, L. et JENSEN, T. G. 2002. Mechanisms underlying targeted gene correction using chimeric RNA/DNA and single-stranded DNA oligonucleotides. *J. Mol. Med.*, vol. 80, p. 770-781.

BAILLARGEON, J., POLLOCK, B., LEACH, C. et GAO, S. -J. 2004. The association of neoplasms and HIV infection in the correctional setting. *International Journal of STD & AIDS*, vol. 15, p. 348 -351.

BARBARO, G., SCOZZAFAVA, A., MASTROLORENZO, A. et SUPURAN, C. T. 2005. Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr. Pharm. Des.*, vol. 11, p. 1805-1843.

BARTLETT, R. J., STOCKINGER, S., DENIS, M. M., BARTLETT, W. T., INVERARDI, L., LE, T. T., MAN, N., MORRIS, G. F., BOGAN, D. J., METCALF-BOGAN, J. et KORNEGAY, J. N. 2000. *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, p. 615-622.

BAZARBACHI, A., RAFAEL, M., GISSELBRECHT, C. et HERMINE, O. 1997. Lymphomes HTLV-I: aspects cliniques et traitement. *Lymphomes non hodgkiniens*, P. Solal-Celigny, Paris.

BAZARBACHI, A., GHEZ, D., LEPELLETIER, Y., DE THE, H., EL-SABBAN, M. E. et HERMINE, O. 2004. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. *Lancet Oncol.*, vol. 5, p. 664-672.

BERGERON, D., HOUDE, J., POLIQUIN, L., BARBEAU, B. et RASSART, E. 1993. Expression and DNA rearrangement of proto-oncogenes in Cas-Br-E induced non-T, non-B-cell leukemias. *Leukemia*. vol. 7, p. 954-962.

- BERTONI, C., MORRIS, G. E. et RANDO, T. A. 2005. Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum. Mol. Genet.*, vol 15, p. 221-233.
- BOSSI, P., MARTINEZ, V., STRADY, C. et BRICAIRE, F. 2001. Actualités sur les traitements rétroviraux. *Rev. méd. interne.*, vol 222, p. 42-52.
- BRODIN, P., PINSKAYA, M., BUCKLE, M., PARSCH, U., ROMANOVA, E., EMGEL, J., GOTTIKH, M. et MOUSCADET, J. F. 2002. Disruption of HIV-1 integrase-DNA complexes by short 6-oxocytosine-containing oligonucleotides. *Biochemistry.* vol 41, p.529-358.
- BROWN, D. A., KANG, S. H., GRYAZNOV, S. M. DEDIONISIO, L., HEIDENREICH, O., SULLIVAN, S., XU, X. et NERENBREG, M. L. 1994. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.*, vol 28, p. 26801-26805.
- BROWN, P. O., 1997. Integration, dans COFFIN, J. M., Hughes, S. H. et VARMUS, H. E. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p.161-203.
- BUSHMAN, F. D., FUJIWARA, T. CRAIGIE, R. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein *in vitro*. *Science*, vol 249, p. 1555-1558.
- BUSHMAN, F. D. et CRAIGIE, R. 1991. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein *in vitro*: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 88, p. 1339-1343.
- CHEN, Q. R., ZHANG, L., STASS, S. A. et MIXSON, M.J. 2000. CO-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes. *Gene Ther.*, vol 7, p. 1698-1705.
- CHEREPA NOV, P., PLUYMERS, W., CLAEYS, A., PROOST, P., DE CLERCQ, E. et DEBYSER, Z. 2000. High-level expression of active HIV-1 integrase from a synthetic gene in human cells. *FASEB J.*, vol 14, p. 1389-1399.
- COLE-STA USS, A., YOON, K., XIANG, Y., BYME, B. C., RICE, M. C., GRYN, J., HOLLOMAN, W. K. et KMIEC, E. B. 1996. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*, vol 273, p. 1386-1389.
- COLE-STA USS, A., GAMPER, H., HOLLOMAN, W. K., MUNOZ, M., CHENG, N. et KMIEC, E.B. 1999. Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res.*, vol 27, p. 1323-1330.
- CROOK, S.T. 1993. Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties. *FASEB J.*, vol 7, p. 533-539.

- CZUB, M., CZUB S., Mc ATTEE, F. J. et PORTIS, J. L. 1991. Age-dependant resistance to murine retrovirus-induced spongiform neurodegeneration result from central nervous system-specific restriction of virus replication. *J. Virol.*, vol 65, p. 2539-2544.
- CZUB, M., MC ATTEE, F. J. et PORTIS, J. L. 1992. Murine retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy : host and viral factors witch determine the length of the incubation period. *J. Virol.*, vol 66, p. 3298-3305.
- DE CLERCQ, E. 2002. New anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev.*, vol 22, p. 531-565.
- DE CLERCQ, E. 2005. Emerging anti-HIV drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, vol 10, p. 241-273.
- DEPREZ, E., TAUC, P., LEH, H., MOUSCADET, J. F., AUCLAIR, C. et BROCHON, J. C. 2000. Oligomeric States of the HIV-1 Integrase as measured by time-resolved fluorescence anisotropy. *Biochemistry*, vol 39, p. 9275-9284.
- DE SOULTRAIT, R., V.CAUMONT, A., PARISSI, V., MORELLET, N., VENTURA, M., LENOIR, C., LITVAK, S., FOURNIER, M. et ROQUES, B. 2002. A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type I integrase. *J. Mol. Biol.*, vol 318, p. 45-58.
- DYDA, F., HICKMAN, A. B., JENKINS, T. M., ENGELMAN, A., CRAIGIE, R. ET DAVIES, D. R. 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science*, vol 23, p. 1981-1986.
- EDLICH, R. F., ARNETTE, J. A. Et WILLIAMS, F. M. 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J. Emerg. Med.*, vol 18, p. 109-119.
- ENGELMAN, A., BUSHMAN, F. D. et CRAIGIE, R. 1993. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J.*, vol 12, p. 3269-3275.
- ENGELMAN, A., ENGLUD, G., ORENSTEIN, M., MARTIN, M. A. et CRAIGIE, R. 1995. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J. Virol.*, vol 69, p. 2729-2736.
- ENGELMAN, A. 1999. *In vivo* analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv. Virus Res.*, vol 52, p. 411-426.
- EVANS, L. H., MORRISON, R.P., MALIK, F. G., PORTIS, J. et BRITT, W.J. 1990. A neutralizable epitope common to the envelope glycoproteins of ecotropic, polytropic, xenotropic, and amphotropic murine leukemia viruses. *J. Virol.*, vol 64, p. 6176-6183.

EY, P. L., FREEMAN, N. L., BELA, B., LI, P. et McINNIS, J. L. 1997. Nucleotide sequence of the murine leukaemia virus amphotropic strain 4070A integrase (IN) coding region and comparative structural analysis of inferred polypeptide. *Arch. Virol.*, vol 142, p. 1757-1770.

FIELDS, B., KNIPE, D. M. et HOWLEY, P. M. 1996. *Fundamental virology*. 3<sup>e</sup> édition. Lippincott-Raven Publishers, New York.

FREDRICKSON, T. N., LANGDON, W. Y., HOFFMAN, P. M. HARTLEY, J. W. et MORSE, H. C. 3<sup>ieme</sup>. 1984. Histologic and cell surface antigen studies of hematopoietic tumors induced by Cas-Br-M murine leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol 72(2), p. 447-454.

GAMPER, H. B., Jr COLE-STRAUSS, A., METZ, R., PAREKH, H., KUMAR, R. et KMIEC, E.B. 2000 a. A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry*, vol 39, p. 5808-5816.

GAMPER, H. B., PAREKH, H., RICE, M.C., BRUNER, M., YOUKEY, H et KMIEC, E.B. 2000 b. The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotide can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res.*, vol 28, p. 4342-4339.

GARDNER, M. B., HENDRESON, B. E., OFFICER, J. E., RODGEY, R. W., PARKER, J. C., OLIVER, C., ESTES, J. D. et HUEBNER, R. J. 1973. A spontaneous lower motor neuron disease apparently caused by indigenous type-C RNA virus in wild mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol 51, p. 1243-1254.

GATZA, M. L., WATT, J.C. et MARRIOTT, S.J. 2003. Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. *Oncogene*, vol 22, p. 5141-5149. Review.

GESSAIN, A., BARIN, F., VERNANT, J.-C., GOUT, O., MAURS, L., CALENDER, A. et DE THE, G. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, vol 24, p. 407-410.

GROSCHER, B. et BUSHMAN, F. 2005. Cell cycle arrest in G2/M promotes early steps of infection by human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, vol 79, p.5695-5704.

GURSEL, I., GURSEL, M., ISHII, K. J. et KLINMAN, D. M. 2001. Sterically stabilized cationic liposome improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J. of Immunology*, vol 167, p. 3324-3328.

GULICK, R., MELLORS, J., HAVLIR, D., ERON, J., GONZALEZ, C. et MCMAHON, D. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.*, vol 337, p. 734-739.

HAMMER, S., SQUIRES, K., HUGES, M., GRIMES, j., DEMETER, L. et CURRIER, J. 1997. A controlled trial of tow nucleoside analogues plus indinavir in patients with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. N. Engl. J. Med., vol 337, p. 725-733.

HERMINE, O., ALLARD, I., LEVY, V., ARNULF, B., GESSAIN, A. et BAZARBACHI, A., 2002. A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. Hematol. J., vol 3, p. 276-282.

HU, S. C., COURT, D. L., ZWEIG, M. et LEVIN, J.G. 1986. Murine leukemia virus *pol* gene products: analysis with antisera generated against reverse transcriptase and endonuclease fusion proteins expressed in Escherichia coli. J. Virol., vol 60, p. 267-274.

IGOUCHEVA, O. et YOON, K. 2000. Targetd single base correction by RNA/DNA oligonucleotides. Human Gene Ther., vol 11, p. 2307-2312.

IGOUCHEVA, O., ALEXEEV, V. et YOON, K. 2001. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. Gene Ther., vol 8, p. 391-399.

IGOUCHEVA, O., ALEXEEV, V., PRYCE, M. et YOON, K. 2003. Transcription affects formation and processing of intermediates in oligonucleotide-mediated gene alteration. Nucleic Acids Res., vol 31, p. 2659-2670.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. et SHLOMCHIK, M. 2001. Immunobiology: The immune system in health and disease. 5<sup>e</sup> ed. Garland, New York.

JAYE, A., SARGE-NJIE, R., VAN DER LOEFF, M. S., TODD, J., ALABI, A., SABALLY, S., CORRAH, T. et WHITTLE, H. 2004. No differences in cellular immune responses between asymptomatic HIV type 1- and type 2-infected Gambian patients. J. Infect. Dis., vol 189, p. 498-505.

JENKINS, T. M., ESPOSITO, D., ENGELMAN, A. et CRAIGIE, R. 1997. Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photocrosslinking. EMBO J., vol 16, p.6849-6859.

KAY, D. G., GRAVEL, C., ROBITAILLE, Y. et JOLICOEUR, P. 1991. Retrovirus-induced spongiform myeloencephalopathy in mice : Regional distribution of infected target cells and neuronal loss occuring in the absence of viral expression in neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 88, p. 1281-1285.

KMIEC, E. B., JOHNSON, C. et MAY, G. D. 2001 Chloroplast lysates support directed mutagenesis via modified DNA and chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Plants J., vol 27, p. 267-274.

KREN, B. T., PARASHAR, B., BANDYOPADHYAY, P., CHOWDHURY, N. R., CHOWDHURY, J. R. et STEER, C.J. 1999. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 96, p. 10349-10354.

KUEFLER, P. et BUNN, P.A. 1986. Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Hematol.*, vol 15, p. 695-726.

LAI, L., LIU, H., WU, X. et KAPPES, J.C. 2001. Moloney murine leukemia virus integrase protein augments viral DNA synthesis in infected cells. *J Virol.*, vol 75, p. 11365-11372.

LAL, R. E., CHAKRABARTI, S. et YANG, C. 2005. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J. Med. Res.*, vol 121, p. 287-314.

LAWN, S. D., BUTERA, S. T. et FOLKS, T. M. 2001 Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Microbio.*, vol 14, p. 753-777.

LEAVITT, A. D., SHIUE, L. et VARMUS, H. E. 1993. Site-directed mutagenesis of HIV-1 integrase demonstrates differential effects on integrase functions *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, vol 268, p. 2113-2119.

LEVINE, A. M., SCADDEN, D. T., ZAIA, J. A. et KRISHNAN, A. 2001. Hematologic Aspects of HIV/AIDS. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 2001; p. 463-478.

LIN, S.B., WU, L.C., HUANG, S.L., HSIEH, S.H., CHI, C.W. et AU, L.C. 2000. In vitro and in vivo suppression of growth of rat liver epithelial tumor cells by antisense oligonucleotide against protein kinase C- $\alpha$ . *J Hepatol.*, vol 33, p. 601-608.

LIN, Y.L., PORTALES, P., SEGONDY, M., BAILLAT, V., DE BOEVER, C.M., LE MOING, V., REANT, B., MONTES, B., CLOT, J., REYNES, J. et CORBEAU, P. 2005. CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, vol 15, p. 530-536.

LIU, L. RICE, M.C. et KMIEC, E. B. 2001. *In vivo* gene repair of point and frameshift mutations directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotide and modified single-stranded oligonucleotide. *Nucleic Acids Res.*, vol 29, p. 4238-4250.

LIU, C.-M., LIU, D.-P. et LIANG, C.-C. 2002. Oligonucleotide mediated gene repair at DNA level : the potential applications for gene therapy. *J. Mol. Med.*, vol 80, p. 620-628.

LOKE, S.L., STEIN, C.A., ZHANG, X.H., MORI, K., NAKANISHI, M., SUBASINGHE, C., COHEN, J.S. et NEKERS, L.M. 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 86, p. 3474-3478.

- LYNCH, W. P. et SHARPE, A. H. 2000. Differential Glycosylation of the Cas-Br-E Env protein is associates with retrovirus-induced spongiform neurodegeneration. *J. Virol.*, vol 14, p. 1558-1565.
- LYNCH, W. P. et PORTIS, J. L. 1993. Murine retrovirus-induced spongiform encephalopathy : disease expression is dependent on postnatal development of the central nervous system. *J. Virol.*, vol 67, p. 2601-2610.
- MASUDA, T., PLANELLES, P., KROGSTAD, P. et CHEN, I. S. Y. 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 *att* site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J. Virol.*, vol 69, p. 6687-6696.
- MAHIEUX, R. et GESSAIN, A. 2003. HTLV-I and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol.* vol 7, p. 336-361. Review.
- MORISHITA, R., GIBBON, G. H., KANEDA, Y., ZHANG, L. et OGIHARA, T. 2002. Apolipoprotein E-deficient mice created by systemic administration of antisense oligodeoxynucleotides: a new model for lipoprotein metabolism studies. *Journal of Endocrinology*, vol 175, p. 475-485.
- MORTREUX, F., GABET, A. S WATTEL, E. 2003. Molecular and cellular aspects of HTLV-I associated leukemogenesis *in vivo*. *Leukemia*, vol 17, p. 26-38.
- MULDER, L. C., CHAKRABARTI, L. A. et MUESING, M. A. 2002. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *J. Biol. Chem.*, vol 277, p. 27489-27493.
- NARAYAN, M., KUSUHARA, K. et GREEN, P. I. 2001. Phosphorylation of Two Serine Residues Regulates Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 Rex Function. *J. Virol.*, vol 75 (18), p. 8440-8448.
- NASR, R., EL-SABBAN, M. E., KARAM, J. A., DBAIBO, G., KFOURY, Y., ARNULF, B., LEPELLETIER, Y., BEX, F., DE THE, H., HERMINE, O. et BAZARBACHI, A. 2005. Efficacy and mechanism of action of the proteasome inhibitor PS-341 in T-cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*, vol 24, p. 419-430.
- OGER, J. J., WERKER, D. H., FOTI, D. J. et DEKABAN, G. A. 1993. HTLV-I associated myelopathy: an endemic disease of Canadian aboriginals of the Northwest Pacific coast? *Can. J. Neurol. Sci.*, vol 20, p. 302-306.
- OSAME, M., USUKU, K., IZUMO, S. IJICHI, N., AMITANI, H., IGATA, A., MATSUMOTO, M. Et TARA, M. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, vol 3, p. 1031-1032.
- PIERSON, T., Mc ARTHUR, J. et SILICIANO, R. F. 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.*, vol 18, p. 665-708.

POIESZ, B. J., RUSCETTI, F. W., MIER, J. W., WOODS, A. M. et GALLO, R.C. 1980. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 77, p. 6815-6819.

POMMIER, Y., MARCHAND, C. et NEAMATI, N. 2000. Retroviral integrase inhibitors years 2000: update and perspectives. *Antiviral Res.*, vol 47, p. 139-149.

POMMER, Y., JOHNSON, A. A. et MARCHAND, C. 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol 4, p. 236-248.

PONNAPPA, B. C., ISRAEL, Y., AINI, M., ZHOU, F., RUSS, R., CAO, Q. N., HU, Y. et RUBIN, R. 2005. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisens oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.*, vol 15, p. 569-577.

PORTIS, J. L., MC ATEE, F. J. et HAYES, S. F. 1987. Horizontal transmission of murine retroviruses. *J. Virol.*, vol 61, p. 1037-1044.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J. P. et KLEINE, D. A. 1995. Microbiologie. DeBoeck Université, Bruxelles.

RANDO, T. A., DISATNIK, M. H. et ZHOU, L. Z. 2000. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 97, p. 5363-5368.

RICHMAN, D. D. 1993. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Review. Antimicrob Agents Chemother.*, vol 37, p. 1207-1213.

RODGERS-JOHNSON, P., GAJDUSEK, D. C., MORGAN, O. S., ZANIOVIC, V., SARIN, P. S. Et GRAHAM, D. S. 1985. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*, vol 30, p. 1247-1248.

ROTH, M., J., SCHWARTZBERG, P., TANESE, N. et GOFF, S. P. 1990. Analysis of mutations in the integration function of Moloney murine leukemia virus: effects on DNA binding and cutting. *J. Virol.*, vol 64, p. 4709-4717.

RUDICH, A., BEN-ROMANO, R., ETZION, S. et BASHAN, N. 2005. Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and arteriosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol. Scand.*, vol 183, p. 75-88.

SANTÉ CANADA. 1995. Relevé des maladies transmissibles au Canada, RMTC. Cas d'infection par le HTLV-I signalés en Colombie-Britannique. Agence de santé publique du Canada. Février 1995.



SANTÉ CANADA. 2002. Le VIH et le sida au Canada. Rapport de surveillance en date du 30 juin 2002. Division de l'épidémiologie et de la surveillance du VIH/sida, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada. Novembre 2002.

SHIN, C.-G., TADDEO, B., HASELTINE, W. A. et FARNET, C. M. 1994. Genetic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *J. Virol.*, vol 68, p. 1633-1642.

SHTALRID, M., SHVIDEL, L., KORENFELD, R., DUCK, A., LANDAU, Z. ET BERREBI, A. 2005. HTLV-1 associated adult T-cell leukemia/lymphoma in Israel: report of two patients of Romanian origin. *Haematologica*. vol 90 : ECR13.

SITBON, M., NISHIO, J., WEHRLY, K., LODMELL, D. et CHESEBRO, B. 1985. Use of a focal immunofluorescence assay on live cells for quantification of retrovirus: distinction of host range classes in virus mixtures and biological cloning of dual-tropic Murine Leukemia Virus. *Virology*, vol 141, p. 110-118.

STEIN, C.A. et CHENG, Y.C. 1993. Antisens oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science*, vol 261, p. 1004-1012.

TADDEO, B., HASELTINE, W. A. et FARNET, C. M. 1994. Integrase mutants of human immunodeficiency virus type 1 with a specific defect in integration. *J. Virol.*, vol 68, p. 8401-8405.

VERNANT, J. C., MAURS, L., GESSAIN, A., BARIN, F., GOUT, O., DELAPORTE, J.M., SANHADJI, K., BUISSON, G. et DE-THE, G. 1987. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. *Ann. Neurol.*, vol 21, p. 123-130.

VICKERS, T., BAKER, B. F., COOK, P. D., ZOUNES, M., BUCKHEIT, R. W. Jr., GERMANY, J. et ECKER, D. J. 1991. Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic Acids Res.*, vol 19, p.3359-3368.

WILSON, A., ZHOU, W., CHAMPION, H. C., ALBER, S., TANG, Z. L., KENNEL, S., WATKINS, S., HUANG, L., PITT, B. et LI, S. 2005. Targeted Delivery of Oligodeoxynucleotides to Mouse Lung Endothelial Cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Ther.* Article sous presse.

WU, X., LIU, H., XIAO, H., CONWAY, J. A., HEHL, E., KALPANA, G. V., PRASAD, V. et KAPPES, J. C. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J. Virol.*, vol 73, p. 2126-2135.

YAKUBOV, L.A., DEEVA, E.A., ZARYTOVA, V.F., IVANOVA, E.M., RYTE, A.S., et VALSSOV, V.V. 1989. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 86, p. 6454-6458.

YOON, K., COLE-STRAUSS, A. et KMIEC, E. B. 1996. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 93, 2071-2076.

YOSHIDA, M., SEIKI, M., YAMAGUCHI, K. et TAKATSUKI, K. 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 81, p. 2534-2537.

ZHU, T., PETERSON, D. J., TAGLIANI, L., ST-CLAIR, G., BASZCZYNSKI, C. L. et BOWEN, B. 1999. Targeted manipulation of maize genes *in vivo* using chimeric RNA/DNA oligonucleotides Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 96, p. 8768-8773.